

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

Evolución temporal de la expresión de los receptores de melatonina en un modelo murino de glaucoma: potencial terapéutico del 5-MCA-NAT como agente hipotensor

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Martínez Águila

Directores

Jesús J. Pintor Just
María Rosa Gómez Villafuertes
María Jesús Pérez de Lara

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

Evolución temporal de la expresión de los receptores de melatonina en un modelo murino de glaucoma: Potencial terapéutico del 5-MCA-NAT como agente hipotensor.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Martínez Águila

Directores

Jesús J. Pintor Just

María Rosa Gómez Villafuertes

María Jesús Pérez de Lara

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS
RECEPTORES DE MELATONINA EN UN MODELO MURINO DE
GLAUCOMA: POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL 5-MCA-NAT
COMO AGENTE HIPOTENSOR.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Martínez Águila

Madrid, 2017



FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV

Calle Arcos de Jalón, 118 28037

Teléfono: 913946859

D. Jesús Pintor Just, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid, **D^a M^a Rosa Gómez Villafuertes**, Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid y **D^a María Jesús Pérez de Lara**, doctora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN

Que **D. Alejandro Martínez Águila**, Máster en Óptica, Optometría y Visión por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado **“Evolución temporal de la expresión de los receptores de melatonina en un modelo murino de glaucoma: Potencial terapéutico del 5-MCA-NAT como agente hipotensor”**, como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Octubre de 2017.

Vº Bº DIRECTORES

Dr. Jesús Pintor Just

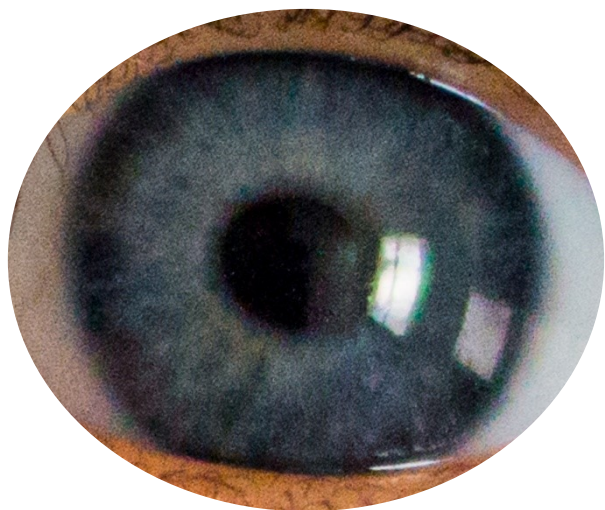
Dra M^a Rosa Gómez Villafuertes

Dra María Jesús Pérez de Lara

El interesado:

Alejandro Martínez Águila

*A Anahi, Ian y Vega,
que lo son todo para mí.*



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar dando las gracias al Dr. Jesús Pintor Just por todos estos años en el laboratorio en los que no sólo he tenido el apoyo de un buen jefe, si no de una gran persona, que me ha permitido poder compaginar el trabajo con la familia, algo prácticamente imposible de encontrar. Gracias por tu energía, optimismo y sobre todo por tu apoyo durante mis problemas personales.

A la Dra Rosa Gómez Villafuertes, que confió en nosotros desde el principio y nos ayudó a realizar la parte de PCR sin dudar un momento, buscando soluciones para los problemas técnicos que teníamos. Gracias por tu ayuda y tu buen humor.

A la Dra María Jesús Pérez de Lara que nos ha enseñado todo sobre los ratones, y ha compartido sus conocimientos de inmunohistoquímica con nosotros. Por tu predisposición a enseñar y a formar a los nuevos becarios y para que todo tu esfuerzo por hacer grande este laboratorio se vea recompensado.

A mis compañeros de laboratorio, con los que he tenido la suerte de poder trabajar y compartir las dificultades de realizar un doctorado.

A Alba, que siempre ha sido un referente en el laboratorio y que, por su bondad y su forma de ser, se ha convertido en una amiga.

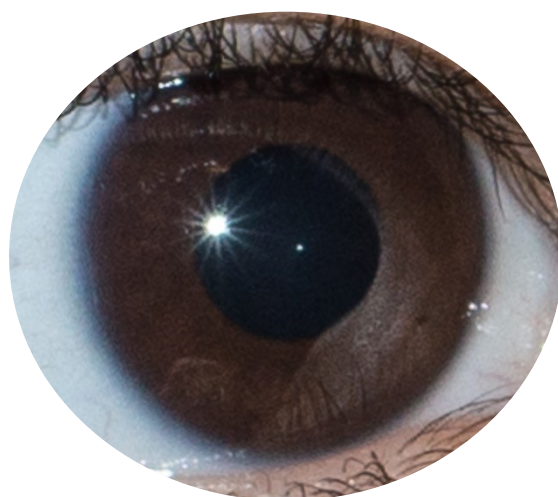
A Bego que ha sido mi “pareja de hecho” en el trabajo desde que fuimos juntos al registro para solicitar una beca. Con ella he podido realizar algo casi imposible, hacer dos Tesis paralelas compartiendo el trabajo y no querer matar a tu compañero. Por haber compartido conmigo las dudas sobre el futuro, las frustraciones de los experimentos fallidos, los fines de semana y noches que tuvimos que estar realizando experimentos y por aguantar mis manías con la colocación de los datos en un super archivo ininteligible para los demás. Gracias Bego por tu aguante y tu ayuda.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mis suegros, a los que sólo se entiende cuando uno se convierte en padre y sin los cuales, no se podría criar igual a los hijos. Gracias por ayudarme a poder realizar este trabajo y confiar en mí.

Y finalmente a la persona más importante, a mi mujer, que fue la que me animó a realizar el máster y la Tesis e hizo que no me conformara con un trabajo anodino ya que, por desgracia, nuestro trabajo no se valora todo lo que se debe. Por ser mi apoyo siempre, por aguantar mis caras y siempre estar a mi lado para ayudarme y guiarme. Por haber querido formar una familia conmigo y criar a nuestros hijos, Ian y Vega, y confiar desde el principio en que todo iba a salir bien. Por ser siempre el lugar donde poder descansar, GRACIAS.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una Beca/Contrato Predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid.



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

4-PPDOT: 4-fenil-2- propionamidotetralina

5-MCA-NAT: 5-Metoxi-carbonilamino-N-Acetilriptamina

AANAT = Arakilamina N-acetiltransferasa

ADN = Ácido desoxirribonucleico

ADNc = Ácido desoxirribonucleico complementario

ADRA₂ = receptor adrenérgico α_2

ADRB₂ = receptores adrenérgicos β_2

AFMK = N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina

ARN = Ácido ribonucleico

ARNm = ARN mensajero

Ct = Ciclo umbral o “cycle treshold”

DAPI = 4', 6-diamidino-2-fenilindol

dNTPs = Desoxinucleótidos trifosfato

ENP = Epitelio no pigmentado

EP = Epitelio pigmentado

GAPDH = Gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HA = Humor acuoso

HIOMT = Hidroxindol-O-metiltransferasa

M-MLV = Enzima transcriptasa inversa del virus de leucemia murina

MT₁ = Receptor de melatonina MT₁

MT₂ = Receptor de melatonina MT₂

ABREVIATURAS

MT₃ = Receptor de melatonina MT₃

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

PFA = Paraformaldehído

PIO = Presión intraocular

Q-PCR = PCR cuantitativa a tiempo real

RT = Retrotranscripción

RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa en retrotranscripción

SNC = Sistema nervioso central

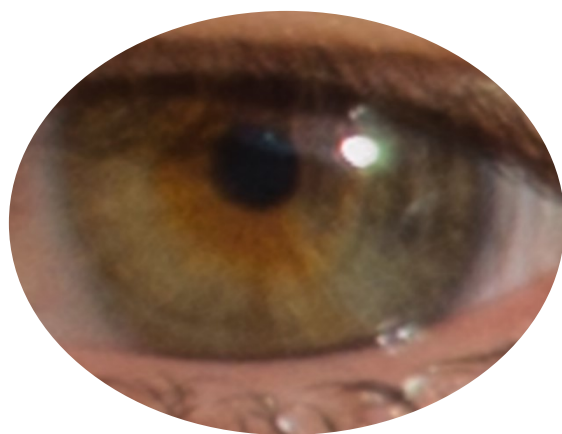
Nomenclatura IUPAC de compuestos:

Agomelatina: N-[2-(7-metoxinaftalen-1-il) etil]acetamida

Melatonina: N-acetil-5-metoxitriptamina

Luzindol: N-acetil-2-benzilriptamina

Prazosin: 1-(4-Amino-6,7-dimetoxi-2-quinazolinil)-4-(2-furanilcarbonil) piperazina



ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS.....	VII
ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	13
SUMMARY	17
I. INTRODUCCIÓN	23
1. EL SISTEMA VISUAL	23
1.1. ANATOMÍA GENERAL DEL GLOBO OCULAR.....	23
1.2. POLO ANTERIOR.....	25
1.2.1. IRIS.....	25
1.2.2. CUERPO CILIAR	26
1.2.2.1. HUMOR ACUOSO.....	27
1.2.2.2. PRESIÓN INTRAOCULAR.....	29
2. GLAUCOMA	31
2.1. PATOLOGÍA.....	31
2.2. TRATAMIENTOS.....	32
2.2.1. ANÁLOGOS DE LAS PROSTAGLANDINAS	33
2.2.2. BETABLOQUEANTES	33
2.2.3. AGONISTAS SELECTIVOS ADRENÉRGICOS ALFA-2	34
2.2.4. AGONISTAS COLINÉRGICOS	34
2.2.5. INHIBIDORES DE ANHIDRASA CARBÓNICA	35
2.2.6. NUEVAS OPCIONES DE TRATAMIENTO	35
3. MODELOS ANIMALES DE GLAUCOMA	36
3.1. CONDICIÓN DE HIPERTENSIÓN TRANSITORIA.....	39
3.1.1. POSICIÓN DE TRENDELEMBURG.....	39
3.1.2. OTROS	39
3.2. RATÓN DBA/2J.....	40
4. COMPUESTOS MELATONINÉRGICOS.....	42
4.1. BIOSÍNTESIS DE MELATONINA	42
4.2. SECRECIÓN DE MELATONINA	43
4.3. METABOLISMO DE MELATONINA.....	44

4.4.	REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE MELATONINA.....	45
4.5.	ACCIONES DE LA MELATONINA.....	46
5.	RECEPTORES DE MELATONINA.....	47
5.1.	LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES DE MELATONINA	50
5.1.1.	LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES DE MELATONINA EN EL OJO	51
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
1.	JUSTIFICACIÓN	57
2.	HIPÓTESIS	58
3.	OBJETIVOS	58
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	63
1.	MATERIALES	63
1.1.	REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS	63
1.2.	INSTRUMENTOS Y MATERIALES	65
1.3.	MEDIOS Y TAMPONES	66
1.4.	MATERIAL BIOLÓGICO. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	66
1.5.	PROGRAMAS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	68
2.	MÉTODOS.....	69
2.1.	MEDIDAS DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR	69
2.1.1.	Monitorización de la presión intraocular en ratones	69
2.2.	CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA EN RATONES	74
2.3.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	75
2.4.	INMUNOHISTOQUÍMICA	83
2.4.1.	Obtención de las secciones de los procesos ciliares	83
2.4.2.	Inmunofluorescencia del tejido	84
2.4.3.	Análisis de las imágenes mediante Image J	85
2.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	86
IV.	RESULTADOS.....	91
1.	EFFECTO DE LOS AGONISTAS DE MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES	91
1.1.	EFFECTO DE LOS AGONISTAS DE MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN CONEJOS NORMOTENSOS.....	92
1.2.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE TRENDLENBURG COMO MODELO TRANSITORIO DE HIPERTENSIÓN.	97
1.3.	EFFECTO DE LOS AGONISTAS DE MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN CONEJOS EN CONDICIONES HIPERTENSAS.....	98
1.4.	EFFECTO DE LOS AGONISTAS DE MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN RATONES C57BL/6J Y DBA/2J.....	99

1.5. EFECTO DEL 5-MCA-NAT COMO TRATAMIENTO A LARGO PLAZO SOBRE LOS RATONES C57BL/6J Y DBA/2J.	105
2. EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS TRANSCRITOS DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LOS PROCESOS CILIARES DE RATONES C57BL/6J Y DBA/2J.	106
2.1. EL RECEPTOR MT ₁	108
2.2. EL RECEPTOR MT ₂	109
2.3. EL RECEPTOR GPR50	110
3. ESTUDIOS DE INMUNOLocalIZACIÓN DE RECEPTORES DE MELATONINA EN RATONES C57BL/6J Y DBA/2J.	111
3.1. EL RECEPTOR MT ₁	111
3.2. EL RECEPTOR MT ₂	113
3.3. EL RECEPTOR GPR50	115
V. DISCUSIÓN	121
VI. CONCLUSIONES	135
VII. BIBLIOGRAFÍA	139
VIII. ANEXO	161



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

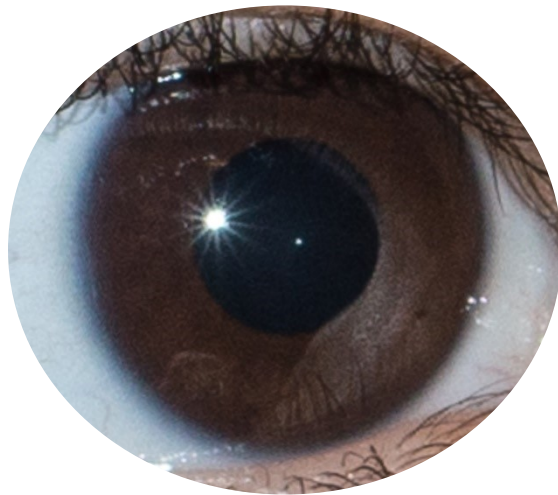
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.- Diagrama esquemático de una sección horizontal del ojo humano.	24
Figura I.2.- Secciones y diagrama del cuerpo ciliar del ojo humano.	27
Figura I.3.- Ángulo iridocorneal: Vías implicadas en el drenaje del humor acuoso.	29
Figura I.4.- Representación esquemática de la transformación de serotonina a melatonina.	43
Figura I.5.- Representación esquemática la melatonina y sus análogos 5-MCA-NAT y agomelatina.	50
Figura I.6.- Localización de los receptores de melatonina en el globo ocular.	54
Figura III.1.- Equipo de anestesia superficial con isofluorano.	70
Figura III.2.- Cámara de sedación y cono nasal para liberación de isofluorano	70
Figura III.3.- Modelo de hipertensión ocular inducido por la posición de Trendelenburg.	72
Figura III.4.- Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una Q-PCR.	80
Figura III.5.- Modelo de las curvas obtenidas en una reacción de Q-PCR.....	81
Figura IV.1.- Efecto de la melatonina y sus análogos sobre la PIO a lo largo del tiempo en conejos albinos de la raza Nueva Zelanda.....	93
Figura IV.2.- Curva dosis-respuesta de agomelatina sobre la presión intraocular.	94
Figura IV.3.- Efecto de los antagonistas melatoninérgicos en la respuesta de agomelatina sobre la presión intraocular.	95
Figura IV.4.- Efecto de algunos compuestos antiglaucomatosos comerciales en comparación con agomelatina sobre la presión intraocular.	96
Figura IV.5.- Variación de la presión intraocular con el tiempo en posición de Trendelenburg.	97
Figura IV.6.- Efecto máximo de los análogos de melatonina en posición horizontal y en posición de Trendelenburg.	99
Figura IV.7.- Evolución temporal de la PIO en ratones C57BL/6J y DBA/2J.....	100
Figura IV.8.- Efecto de la melatonina y sus análogos sobre la PIO a lo largo del tiempo en ratones C57BL/6J y DBA/2J.....	101
Figura IV.9.- Curva dosis-respuesta de melatonina y 5-MCA-NAT sobre la presión intraocular.	103
Figura IV.10.- Efecto de los antagonistas melatoninérgicos en la respuesta de melatonina y 5-MCA-NAT sobre la presión intraocular.	104

Figura IV.11.- Efecto del tratamiento continuado con 5-MCA-NAT sobre la presión intraocular en ratones C57BL/6J y DBA/2J.....	105
Figura IV.12.- Expresión de receptores de melatonina en los procesos ciliares de ratones C57BL/6J.	107
Figura IV.13.- Patrón temporal de los niveles de ARNm de MT1 en los procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	108
Figura IV.14.- Patrón temporal de los niveles de ARNm de MT2 en los procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	109
Figura IV.15.- Patrón temporal de los niveles de ARNm de GPR50 en los procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	110
Figura IV.16A.- Distribución celular del receptor MT1 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	112
Figura IV.16B.- Cuantificación de la fluorescencia del receptor MT1 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	113
Figura IV.17A.- Distribución celular del receptor MT2 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	114
Figura IV.17B.- Cuantificación de la fluorescencia del receptor MT2 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	115
Figura IV.18A.- Distribución celular del receptor GPR50 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	116
Figura IV.18B.- Cuantificación de la fluorescencia del receptor MT2 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1.- Estudio comparativo de algunos de los parámetros oculares en humano, conejo y ratón.	42
Tabla III.1.- Relación de los principales reactivos y compuesto químicos utilizados.....	64
Tabla III.2.- Agonistas, antagonistas e inhibidores	64
Tabla III.3.- Equipos, instrumentos y materiales empleados	65
Tabla III.4.- Medios y tampones	66
Tabla III.5.- Programas y herramientas informáticas	68
Tabla III.6.- Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia del tejido	85
Tabla IV.1.- Variación de la PIO en posición prona y Trendelenburg con varios compuestos comerciales.	98



RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

El glaucoma es una neuropatía óptica progresiva crónica caracterizada por una degeneración de las células ganglionares retinianas y un daño a la cabeza del nervio óptico. De esta forma, hay una pérdida progresiva de campo visual que finalmente puede provocar ceguera (Quigley, 2011).

Uno de los grupos de nuevos tratamientos más prometedores son la melatonina y sus derivados, que se han mostrado eficaces en el tratamiento del glaucoma tanto en animales (Martinez-Aguila et al., 2016, Crooke et al., 2012, Martinez-Aguila et al., 2013, Serle et al., 2004, Alarma-Estrany et al., 2011, Crooke et al., 2013) como en humanos (Pescosolido et al., 2015, Ismail and Mowafi, 2009).

OBJETIVO:

Determinar el papel de los compuestos melatoninérgicos en la patología glaucomatosa. En concreto se ha evaluado el efecto de la melatonina y análogos sobre la presión intraocular (PIO) en conejos albinos de Nueva Zelanda, medidos en condiciones normotensas e hipertensas, así como en ratones C57BL/6J y DBA/2J, realizando una caracterización farmacológica de los mismos. A su vez, se ha realizado un tratamiento continuado con el 5-MCA-NAT para verificar si dicho compuesto puede contrarrestar el aumento de la PIO. Por último, se ha determinado la localización de los receptores de melatonina MT₁, MT₂ y GPR50, además de la variación en el tiempo de la expresión de los genes de melatonina en ambos animales.

RESULTADOS:

Los resultados obtenidos indican que bajo las condiciones hipertensas en conejos albinos de la raza Nueva Zelanda, el 5-MCA-NAT fue el mejor compuesto reduciendo la PIO (71%) y la agomelatina fue más efectiva (47%) que melatonina (23%).

Al comparar con Xalatan®, Trusopt®, Timofтол® y Alphagan®, se comprueba que el 5-MCA-NAT fue igual de eficaz que Xalatan® y Trusopt®, y que la agomelatina fue tan activo como Timofтол® y Alphagan®.

En el modelo animal de los ratones DBA/2J y C57BL/6J, se ha demostrado que el efecto hipotensor de la melatonina es más profundo en el modelo glaucomatoso que en el control (19% frente a 33%), y este efecto también está presente cuando se usa tanto 5-MCA-NAT (20% frente a 29%), como agomelatina (17% frente a 29%).

Al realizar la caracterización farmacológica de la melatonina y el 5-MCA-NAT en ambos ratones, se comprobó que el efecto de ambos era revertido por cualquiera de los antagonistas probados en el C57BL/6J. Sin embargo, en el ratón glaucomatoso DBA/2J tanto luzindol como 4PPDOT pudieron revertir por completo el efecto de la melatonina, pero sólo este último tuvo efecto sobre la acción del 5-MCA-NAT.

El tratamiento continuado con 5-MCA-NAT aplicado 3 veces a la semana durante 3 meses, desde el 6º al 9º mes produjo buenos resultados. Estos experimentos demostraron una clara tendencia del 5-MCA-NAT a contrarrestar el aumento de la PIO observado en los animales no tratados. Aunque parece existir un efecto aparente desde la semana 8ª de tratamiento, no es estadísticamente significativo hasta las 2 últimas semanas. Es muy probable que con una aplicación diaria de este análogo de la melatonina y/o usando un número mayor de animales, los errores serían menores y, en consecuencia, las diferencias serían estadísticamente significativas más cerca del comienzo de aplicación del 5-MCA-NAT.

Si esto pasara, la presión se contralaría mejor, y la evolución de la patología se pararía como pasa con otros tratamientos farmacológicos (Bhowmik, 2012).

Se ha demostrado que la expresión de los receptores de melatonina decae con el desarrollo de la patología glaucomatosa, siendo el receptor de melatonina MT₂ el más afectado por la reducción de sus niveles de expresión. Esto implica que el efecto hipotensor fisiológico de la melatonina endógena reduciendo la PIO ya no es posible en dicha condición. Una solución para estos cambios en la expresión de los receptores es

la aplicación exógena de melatonina o cualquiera de sus análogos para permitir la activación de los restantes receptores de melatonina.

En otros estudios se ha demostrado la eficacia de la melatonina y la agomelatina en la protección de los daños oxidativos retinianos causados por el glaucoma (Gressens et al., 2008, Srinivasan et al., 2011, Wongprayoon and Govitrapong, 2017, Ramos et al., 2017, Chumboatong et al., 2017)

Todos estos efectos positivos protegerían a la retina del desarrollo ulterior de la patología, lo que hace que estos compuestos melatoninérgicos puedan expandir el repertorio actual de medicamentos usados para el tratamiento de la hipertensión ocular y puedan situarse como potenciales medicamentos para el tratamiento del glaucoma, tanto para el tratamiento de la PIO como para la protección retiniana necesaria.

CONCLUSIONES:

Tanto melatonina como sus análogos, 5-MCA-NAT y agomelatina, disminuyen la PIO en condiciones normotensas y en mayor medida, en condiciones hipertensas/glaucomatosas. En estas condiciones actúan bajando la PIO principalmente a través de los receptores MT₂. El tratamiento continuado con 5-MCA-NAT, con sólo 3 aplicaciones semanales durante 3 meses, contrarresta la subida de PIO propia del ratón glaucomatoso, disminuyéndola en un 14%. Existe una disminución de la expresión de los receptores de melatonina MT₁, MT₂ y GPR50 con la evolución de la patología glaucomatosa que impide que la melatonina endógena pueda contrarrestar el aumento de la PIO.

En resumen, los compuestos melatoninérgicos son unos buenos candidatos para el tratamiento del glaucoma, dado su efecto sobre la PIO y su acción neuroprotectora, aún sin la mejor formulación oftálmica.

SUMMARY

INTRODUCTION:

Glaucoma is a chronic progressive optic neuropathy characterized by degeneration of retinal ganglion cells and damage to the optic nerve head. In this way, there is a progressive loss of visual field that can eventually lead to blindness (Quigley, 2011). One of the most promising new treatment groups are melatonin and its derivatives, which have been shown to be effective in treating glaucoma in both animals (Martinez-Aguila et al., 2016, Crooke et al., 2012, Martinez-Aguila et al., 2013), as well as in humans (Pescosolido et al., 2015, Ismail and Mowafi, 2009).

OBJECTIVE:

To determine the role of melatoninerpic compounds in glaucomatous pathology. The effect of melatonin and analogues on IOP in New Zealand albino rabbits, measured in normotensive and hypertensive conditions, as well as in C57BL/6J and DBA/2J mice, have been evaluated, making a pharmacological characterization of them. In turn, continuous treatment with 5-MCA-NAT has been performed to verify if this compound can counteract the increase in IOP. Finally, we have investigated the location of the melatonin receptors MT₁, MT₂ and GPR50, in addition to the change in their expression along the time of melatonin genes in both animals.

RESULTS:

The results obtained indicate that under hypertensive conditions in New Zealand albino rabbits, 5-MCA-NAT was the best compound reducing IOP (71%) and agomelatine was more effective (47%) than melatonin (23%).

SUMMARY

When comparing with Xalatan®, Trusopt®, Timofтол® and Alphagan®, 5-MCA-NAT was found to be just as effective as Xalatan® and Trusopt®, and that agomelatine was as active as Timofтол® and Alphagan®.

In DBA/2J and C57BL/6J mice model the hypotensive effect of melatonin has been shown to be deeper in the glaucomatous model than in control (19% versus 33%), and this effect is also present when both 5-MCA-NAT (20% vs 29%) and agomelatine (17% vs 29%) were used.

When the pharmacological characterization of melatonin and 5-MCA-NAT in both mice was assessed, the effect of both was reversed by any of the antagonists tested on C57BL/6J. However, in the DBA/2J glaucomatous mouse both luzindol and 4PPDOT could completely reverse the effect of melatonin, but only the latter influenced the action of 5-MCA-NAT.

Subsequently a continuous treatment with 5-MCA-NAT was applied 3 times a week for 3 months, from the 6th to the 9th month. This experiment demonstrated a clear tendency of 5-MCA-NAT to counteract the increase in IOP observed in untreated animals. Although there is an apparent effect from the 8th week of treatment, it is not statistically significant until the last 2 weeks. It is very likely that with a daily application of this melatonin analogue and/or using a larger number of animals, the errors would be lower and, consequently, the differences would be statistically significant closer to the start of application of 5-MCA-NAT.

If this were to happen, the pressure would be better controlled, and the evolution of the pathology would stop like other pharmacological treatments (Bhowmik, 2012).

It has been shown that the expression of melatonin receptors declines with the development of glaucomatous pathology, with the melatonin receptor MT₂ being the most affected by the reduction of their expression levels. This implies that the physiological hypotensive effect of endogenous melatonin by reducing IOP is no longer

possible in this condition. One solution to these changes in receptor expression is the exogenous application of melatonin or any of its analogues to allow the activation of the remaining melatonin receptors.

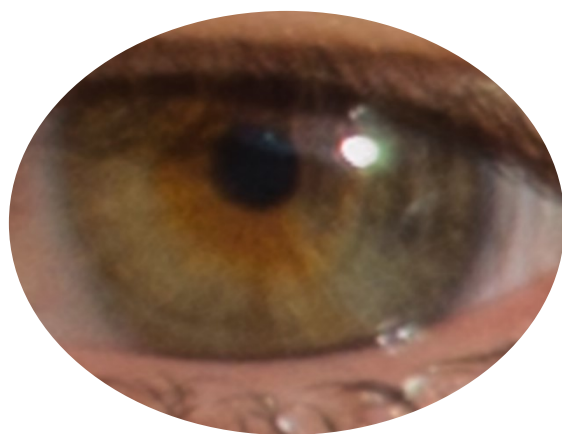
Other studies have demonstrated the efficacy of melatonin and agomelatine in protecting retinal oxidative damage caused by glaucoma (Gressens et al., 2008, Srinivasan et al., 2011, Wongprayoon and Govitrapong, 2017, Ramos et al., 2017, Chumboatong et al., 2017).

All these positive effects would protect the retina from further development of pathology, which makes these melatoninerpic compounds expand the current repertoire of drugs used for the treatment of ocular hypertension and can be placed as potential drugs for the treatment of glaucoma, both for the treatment of IOP as well as for the necessary retinal protection.

CONCLUSIONS:

Both, melatonin and its analogues, 5-MCA-NAT and agomelatine, decrease IOP in normotensive conditions and, to a greater extent, in hypertensive/glaucomatous conditions. In this condition they act by lowering the IOP mainly through the MT₂ receptors. Continuous treatment with 5-MCA-NAT, with only 3 applications per week for 3 months, counteracts the rise in the IOP of the glaucomatous mouse, reducing it by 14%. There is a decrease in the expression of melatonin receptors MT₁, MT₂ and GPR50 with the evolution of glaucomatous pathology that prevents endogenous melatonin from counteracting the increase in IOP.

In summary, melatoninerpic compounds are good candidates for the treatment of glaucoma, given its effect on IOP and its neuroprotective action, even without the best ophthalmic formulation.



INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA VISUAL

El ojo es considerado el órgano de la visión. Es una estructura altamente especializada en la fotorrecepción, proceso mediante el cual la energía lumínica proveniente del entorno produce una serie de cambios en las células nerviosas especializadas de la retina (conos y bastones). Estos cambios son transformados en potenciales nerviosos de acción (fototransducción) y transmitidos a las áreas visuales del cerebro a través del nervio óptico, donde dicha información es procesada, llevándose a cabo el complejo proceso conocido como visión (Forrester et al., 2016).

El resto de estructuras oculares, como los párpados, músculos extraoculares o la glándula lagrimal, son secundarias para este proceso fisiológico, aunque necesarias para permitir un correcto funcionamiento del sistema visual (Levin and Adler, 2011).

1.1. ANATOMÍA GENERAL DEL GLOBO OCULAR

El globo ocular humano es aproximadamente una esfera de unos 2.5 cm de diámetro que ocupa un volumen de 6.5 ml. Sin embargo, en realidad está constituida por dos segmentos de esferas, uno anterior más pequeño, llamado córnea, que posee curvatura mayor que la esclera, que constituye el segmento más grande de esfera. La córnea abarca un sexto de la circunferencia total del globo y posee un radio de 7,8 mm; los cinco sextos restantes están formados por la esclera, que tiene un radio de 11,5 mm. La longitud axial media del globo es de 24 mm (Forrester et al., 2016).

El ojo está situado en la porción anterior de la órbita y está constituido por tres capas o túnicas básicas. La más externa es la capa protectora (corneoescleral), la capa vascular llamada úvea (compuesta por la coroides, el iris y el cuerpo ciliar) y la capa neural (retina). Estas tres capas rodean al cristalino y los medios transparentes (humor acuoso y cuerpo vítreo). La córnea y la esclera forman juntas una dura envuelta fibrosa que proporciona protección y apoyo estructural al resto de estructuras intraoculares y

INTRODUCCIÓN

sirve para el anclaje de los músculos extraoculares. La unión entre la córnea y la conjuntiva se conoce con el nombre de limbo esclerocorneal (Remington, 2012).

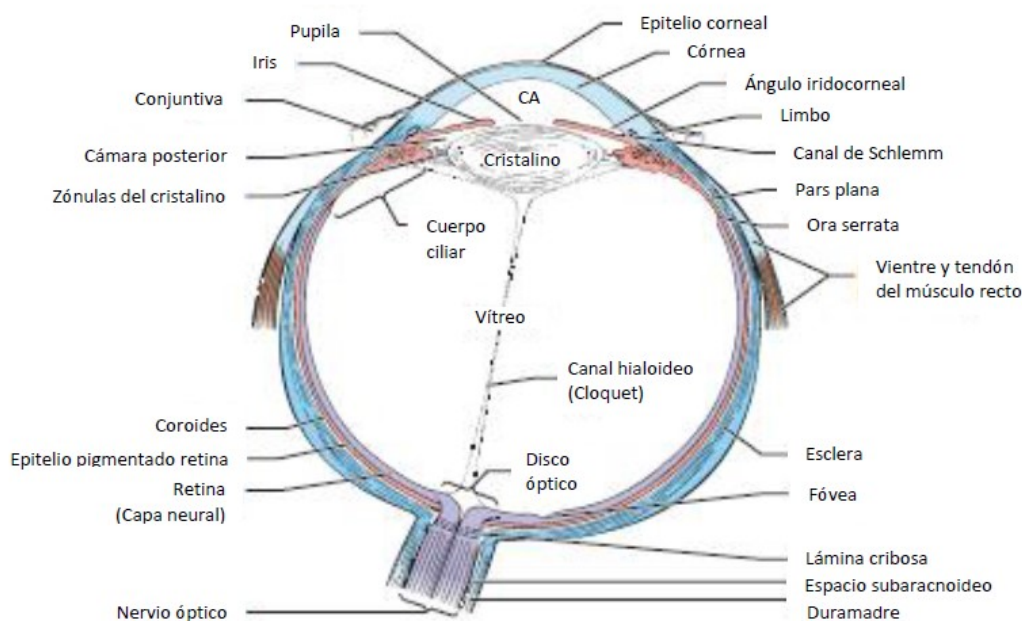


Figura I.1.- Diagrama esquemático de una sección horizontal del ojo humano.

La imagen muestra una representación esquemática de los componentes mayoritarios del ojo y su distribución en tres capas, la capa fibrosa (o corneoesclearal) representada en azul, la capa vascular (o uveal) en rosa, y la capa neural en morado. CA: Cámara anterior. Modificado de (Forrester et al., 2016)

La función del ojo está íntimamente relacionada con las células especializadas de la capa neural: los conos y bastones. Ambos tipos celulares son los encargados de la fotorrecepción, proceso por el cual la luz incidente sobre la retina es transformada en potenciales de acción que pueden ser enviados por el nervio óptico hacia el encéfalo donde se produce finalmente, el fenómeno de la visión (la Cour and Ehinger, 2005). El resto de estructuras oculares, aunque secundarias a esta función, son necesarias para el correcto funcionamiento del sistema visual. Así, la córnea y el cristalino son imprescindibles para la transmisión y el correcto enfoque de la imagen en la retina, mientras que el iris sirve como diafragma para regular la cantidad de luz que alcanza la retina y el cuerpo ciliar es necesario para intervenir en el sistema de acomodación y

para nutrir las estructuras avasculares intraoculares a través del humor acuoso (Forrester et al., 2016).

1.2. POLO ANTERIOR

El polo anterior está compuesto por la córnea, la conjuntiva, el iris, y, el cuerpo ciliar y el cristalino. Dentro de esta porción del globo ocular se encuentra la cámara anterior que contiene el humor acuoso y que está delimitada por iris, el espacio pupilar y el endotelio de la córnea.

1.2.1. IRIS

El iris es un disco circular contráctil, delgado y muy pigmentado que funciona como diafragma. Está suspendido anterior al cristalino y cuerpo ciliar y está rodeado por humor acuoso. El iris separa las cámara anterior y posterior, que se encuentran en continuidad a través de una abertura, la pupila, que se encuentra ligeramente inferonasal al centro del iris. El iris está unido por su raíz en el ángulo iridocorneal de la cámara anterior donde se fusiona con el cuerpo ciliar y la malla trabecular. El borde libre se conoce como margen pupilar.

El iris tiene 12 mm de diámetro con una circunferencia de 37 mm. Tiene forma de cono con el margen pupilar más anterior que la raíz. El tamaño pupilar regula la cantidad de luz que entra en el ojo y es dependiente del estado de contracción de los músculos intrínsecos pupilares, el dilatador y esfínter pupilar. La pupila varía de 1 a 8 mm de diámetro y puede haber un ligero grado de asimetría entre ambos ojos en individuos normales (Forrester et al., 2016).

1.2.2. CUERPO CILIAR

El cuerpo ciliar es aproximadamente como un anillo ancho de unos 5-6 mm que se extiende por la parte anterior desde el espolón escleral hasta *ora serrata* posteriormente. Mide ligeramente más temporalmente que nasalmente y está dividida en dos zonas, una anterior *pars plicata* (*corona ciliaris*) y una posterior *pars plana*. Tiene una forma triangular aproximada en una sección trasversal, con su base frente a la cámara anterior y el ápex entremezclado con la coroides. La *pars plicata* mide unos 2 mm de ancho y consiste en unos 70 pliegues colocados radialmente conocidos como procesos ciliares, cada uno de los cuales mide entre 0,5 y 0,8 mm de alto y 0,5 mm de ancho. Las puntas son más claras como resultado de la disminución de la pigmentación. La *pars plana* es una zona de 4 mm de ancho que va estrechándose desde los límites posteriores de los procesos ciliares hasta *ora serrata*, la unión dentada o serrada donde el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar experimenta una transición brusca para convertirse en la retina neural.

El cuerpo ciliar puede ser dividido histológicamente en el epitelio no pigmentado (ENP), epitelio pigmentado (EP) y el estroma. Participa en funciones como la acomodación, la producción del humor acuoso y la producción de las zónulas cristalinas, los glucosaminoglicanos y el colágeno vítreo.

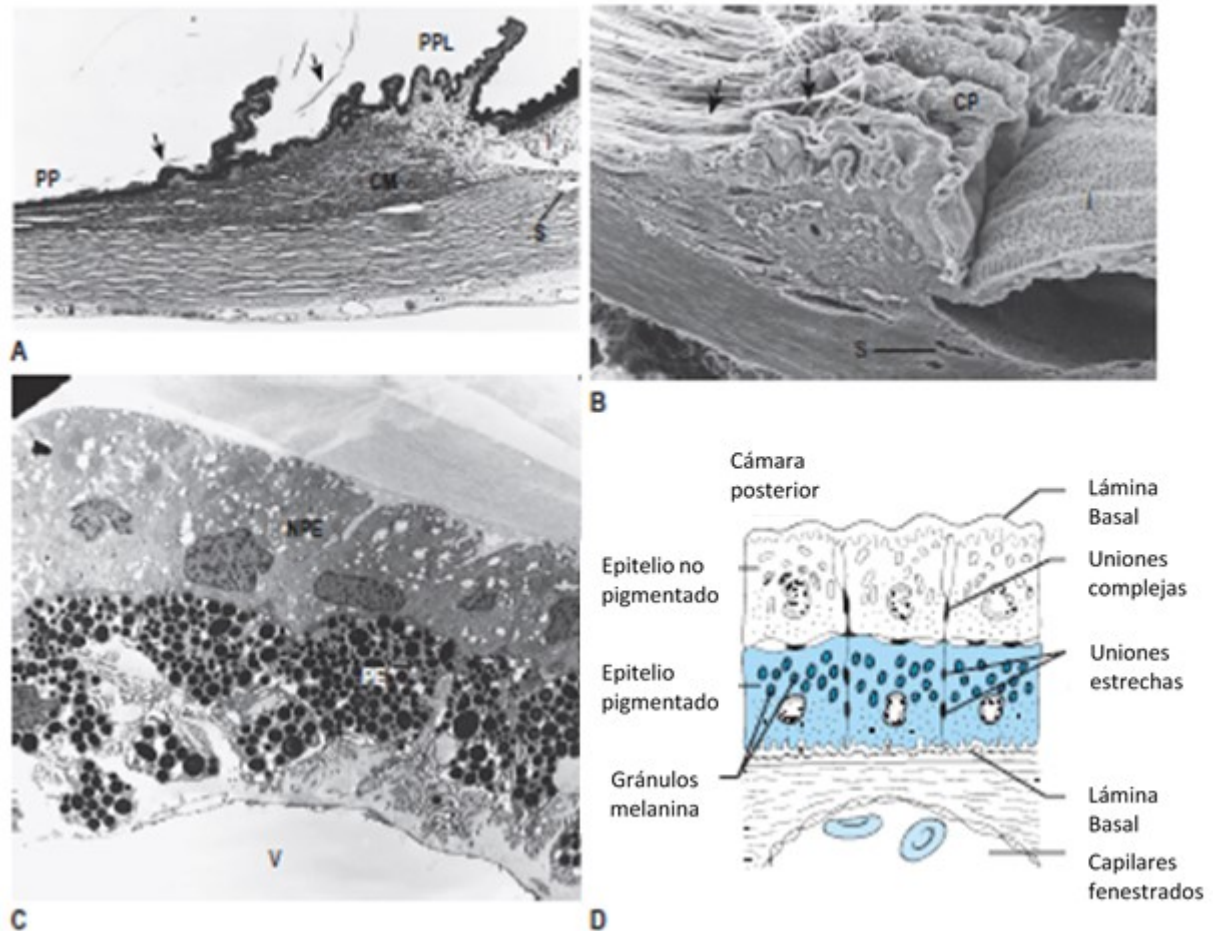


Figura 1.2.- Secciones y diagrama del cuerpo ciliar del ojo humano.

Las imágenes muestran A) sección histológica del cuerpo ciliar que muestra las dos regiones principales, la *pars plana* (PP) y la *pars plicata* (PPL), la cual incluye a los procesos ciliares. B) Micrografía electrónica de barrida de la superficie interior de los procesos ciliares e iris. C) Micrografía electrónica de baja potencia del epitelio ciliar pigmentado y no pigmentado. D) Representación esquemática de la doble capa epitelial, la cual constituye la barrera hematoacuosa. CM: Músculo ciliar; I: Iris; S: Canal de Schlemm; CP: Procesos ciliares; V: Vasos sanguíneos. Modificado de (Forrester et al., 2016)

1.2.2.1. HUMOR ACUOSO

El humor acuoso es un fluido transparente secretado activamente por los procesos ciliares, concretamente por el epitelio no pigmentado, con un volumen aproximado de 250 μ l (Civan et al., 2008).

El humor acuoso está compuesto predominantemente por electrolitos (iones orgánicos e inorgánicos), carbohidratos, glutatión, urea, aminoácidos, proteínas, oxígeno, dióxido de carbono y agua (Dickinson et al., 1968). Aunque el contenido del humor acuoso procede de los capilares fenestrados presentes en el estroma de los procesos ciliares, su composición es diferente de la del plasma sanguíneo. Las principales diferencias son una menor concentración de proteínas en el humor acuoso respecto al plasma sanguíneo, unas 200 veces menos, siendo la principal la albúmina (Krause and Raunio, 1969), y unas mayores concentraciones de ácido ascórbico en el humor acuoso, entre 20 y 50 veces más que en el plasma (Taylor et al., 1991).

El humor acuoso posee múltiples funciones fisiológicas. Contribuye al mantenimiento correcto del metabolismo celular, al proporcionar el oxígeno y nutrientes a las estructuras avasculares que le rodean, como la córnea, el cristalino y la malla trabecular, y a la vez eliminar las sustancias de desecho del metabolismo celular. La elevada concentración de ácido ascórbico mencionada anteriormente sirve para proteger a las estructuras oculares anteriores, como el cristalino, de los daños inducidos por la radiación ultravioleta (Reddy et al., 1998). Además, es un líquido transparente, debido a la escasa presencia de proteínas y posee un índice de refracción de 1.33, por lo que es considerado un componente importante del sistema óptico refractivo del ojo. Pero la función más importante es regular la presión intraocular (PIO), por balance entre la producción y la resistencia al drenaje del humor acuoso, la cual es imprescindible para mantener la configuración esférica y las propiedades ópticas, y por lo tanto para el correcto funcionamiento del sistema visual (Díez and Pujol, 2004, Civan et al., 2008).

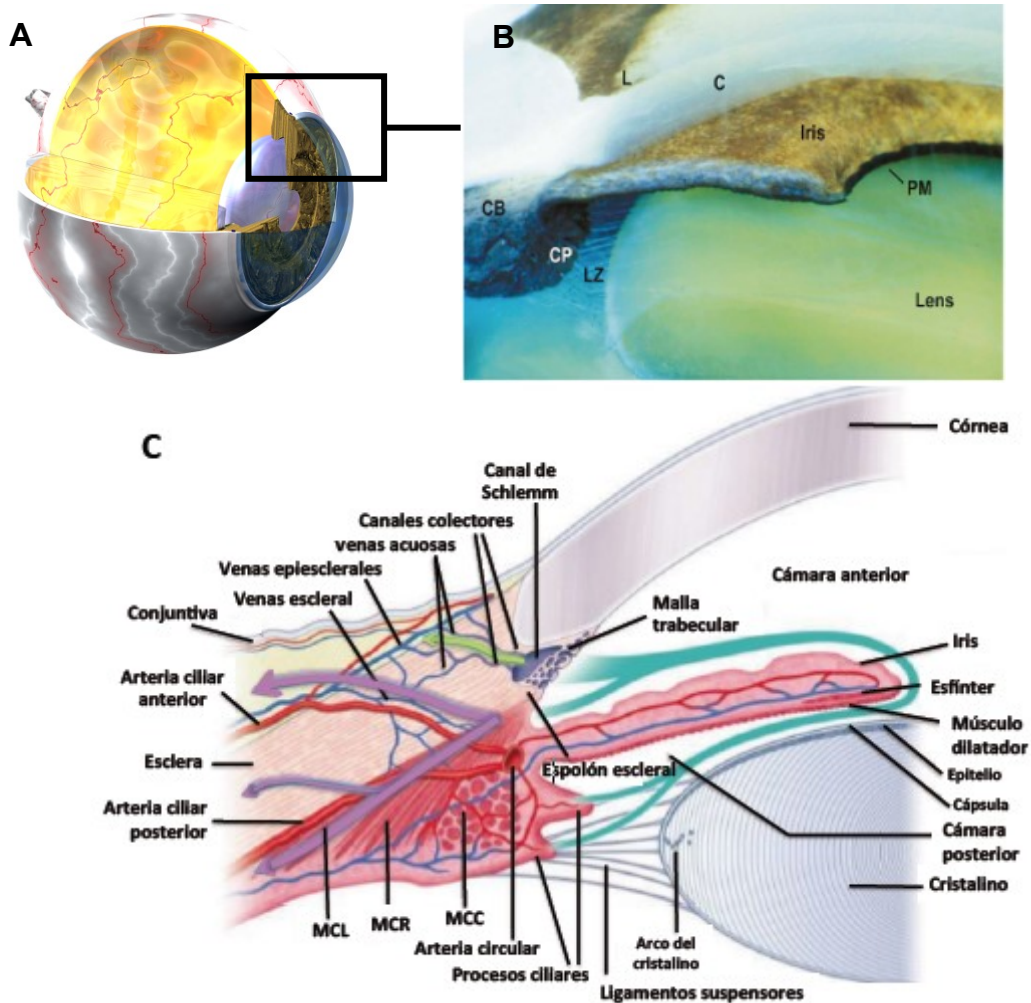


Figura I.3. Ángulo iridocorneal: Vías implicadas en el drenaje del humor acuoso.

A) Imagen esquemática del globo ocular. **B)** Fotografía macroscópica (50X) del segmento anterior del ojo de un primate, donde se indica la posición del limbo pigmentado (L), cornea (C), el cuerpo ciliar (CB), los procesos ciliares (CP), la zónula de Zinn (LZ) y el borde pupilar (MP). Modificado de (Forrester et al., 2016). **C)** Esquema representativo de las vías de drenaje del humor acuoso, donde las flechas azules representan el flujo del humor acuoso desde su formación en los procesos ciliares en la cámara posterior, hasta atravesar la pupila y llegar a la cámara anterior, donde será drenado a través de la vía uveoescleral (flechas moradas) y la vía trabecular (flecha verde). Modificado de (Levin and Adler, 2011).

1.2.2.2. PRESIÓN INTRAOCULAR

El humor acuoso está en renovación continuamente teniendo en flujo de $2.58 \pm 0.78 \mu\text{l}/\text{min}$ durante el día y de $0.98 \pm 0.22 \mu\text{l}/\text{min}$ por la noche (Larsson et al., 1993).

Este fluido es drenado por dos vías, la vía trabecular o convencional, y la vía uveoescleral o no convencional.

La vía convencional es un sistema dependiente de presión que representa el 80-90% de la evacuación del HA en humanos. Bajo condiciones homeostáticas, esta vía regula el drenaje del humor acuoso desde la cámara anterior del ojo, manteniendo de esta forma un PIO constante (Weinreb et al., 2002). Los tejidos implicados en este control de la PIO incluyen al músculo ciliar, la malla trabecular, el canal de Schlemm, los canales colectores y las venas episclerales. El músculo ciliar está anclado posteriormente a la coroides y anteriormente al espolón escleral, a la malla trabecular y a la pared interna del canal de Schlemm (Flugel et al., 1990, Lutjen-Drecoll et al., 1988). La contracción de este musculo provoca la expansión de la malla trabecular y la apertura del canal de Schlemm, lo que provoca una mayor salida del HA a través de la malla trabecular. Esto indica que la malla trabecular es un tejido autorregulado que controla sus funciones a través de los sistemas aferentes y eferentes (Flugel et al., 1990, Selbach et al., 2000).

La segunda vía de evacuación de HA, la vía uveoescleral, se realiza a través del cuerpo ciliar desde el ángulo iridocorneal. El líquido fluye libremente entre los haces musculares y entra en el espacio supracoroideo y supraciliar, desde donde alcanza la esclera (Tamm et al., 2004).

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de la PIO es la tonometría. Los tonómetros pueden ser de dos tipos: de aplanación y de indentación. El de aplanación, mide la fuerza necesaria aplicada, por unidad de superficie para palana la córnea; y el indentación se basa en el principio de que un vástago indenta mas un ojo blando que uno duro. La determinación de la PIO en humanos nos da valores promedio de 15-16 mm Hg que depende del tonómetro usado, siendo el de referencia en la práctica clínica el de Goldmann. (Iester et al., 2009).

2. GLAUCOMA

En 2010, había 4,2 millones de personas con glaucoma en todo el mundo. Esta enfermedad causa un 6,6% (2,1 millones de personas) de los casos de ceguera ($AV < 0,05$) y un 2,2% (4,2 millones de personas) de los casos moderados y severos de discapacidad visual (AV entre 0,05 y 0,33), siendo la mayor causa de ceguera irreversible mundial (Bourne et al., 2016).

Entre 1990 y 2010 en número de personas con ceguera o discapacidad visual debido al glaucoma aumentó en 0,8 y 2,3 millones respectivamente.

Si miramos las cifras en Europa Occidental, estas cifras aumentan debido al envejecimiento de la población, llegando al 10,6% (101.000) de personas ciegas y al 3,4% (253.000) de personas con casos moderados y severos de discapacidad visual (Bourne et al., 2016).

2.1. PATOLOGÍA

El glaucoma es una neuropatía óptica progresiva crónica caracterizada por una degeneración de las células ganglionares retinianas y un daño a la cabeza del nervio óptico. De esta forma, hay una pérdida progresiva de campo visual que finalmente puede provocar ceguera (Quigley, 2011).

Además del efecto de degeneración de las células ganglionares de la retina debido a los factores mecánicos derivados del aumento de la PIO, existen mecanismos moleculares subyacentes que originan la degeneración de estas células. Por lo tanto la pérdida del campo visual es el resultado de la interacción entre un daño axonal primario propiamente mecánico y otros secundarios debidos a la pérdida de factores tróficos, isquemia, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad, plegamiento anómalo de las proteínas y componentes inflamatorios e inmunes (Agudo-Barriuso et al., 2011, Almasieh et al., 2012).

El glaucoma primario de ángulo abierto es la forma más común de presentación de esta patología. Sin embargo, puede haber entre 20 y 30 subtipos de patología y no siempre cursan con una PIO elevada (Roy Chowdhury et al., 2015).

Los factores asociados al incremento del riesgo de padecer glaucoma son una elevada presión intraocular (PIO), una edad avanzada, un historial familiar de padecer glaucoma, ascendencia africana o asiática, ser miope y tener una córnea central delgada (Alsbirk, 1976, Armaly et al., 1980, Coleman and Miglior, 2008, Ernest et al., 2013, Landers et al., 2002, Le et al., 2003, Medeiros et al., 2003, Sommer and Tielsch, 1996). Una PIO elevada es el mayor factor de riesgo y el único factor de riesgo que puede ser modificado para frenar o retardar la pérdida de visión. Incluso para pacientes que tienen PIO baja pero que pierden visión debido al glaucoma, se les recomienda terapias de control de PIO (Lee and Goldberg, 2011, Webers et al., 2008, Grieshaber and Flammer, 2010, Carta et al., 2012).

2.2. TRATAMIENTOS

Existen 3 principales tratamientos para el glaucoma y enfocados en reducir la PIO: terapia farmacológica, terapia con láser y cirugía. Aunque cada uno de estos tipos es efectivo para reducir la PIO, se suele comenzar el tratamiento con fármacos. Y si no se logra reducir lo suficiente la PIO, se combina el tratamiento farmacológico con cirugía o láser (Roy Chowdhury et al., 2015).

Como se ha mencionado antes, la PIO depende del equilibrio entre la formación del HA y su drenaje, que se produce principalmente en la malla trabecular (Do and Civan, 2004, Pattabiraman et al., 2012). Por lo tanto, los fármacos para reducir la PIO buscan disminuir la producción o aumentar el drenaje.

Entre los tipos de fármacos usados se encuentran los análogos de las prostaglandinas, los betabloqueantes, los agonistas selectivos adrenérgicos alfa-2, los

agonistas colinérgicos y los inhibidores de anhidrasa carbónica (Noecker, 2006), cada uno de los cuales será explicado en detalle a continuación:

2.2.1. ANÁLOGOS DE LAS PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas en concentraciones bajas son capaces de reducir de forma notable la PIO por medio de un incremento en el drenaje del humor acuoso por la vía uveoescleral (Bito, 1987, Leung et al., 2008). Son tratamientos muy interesantes, pues con una única administración tópica reducen significativamente la PIO (Fingeret, 2001). Como la mayoría de los tratamientos para el glaucoma, no está exento de efectos secundarios. A nivel ocular, los principales efectos adversos son la hiperemia conjuntival (Parrish et al., 2003), lesiones corneales superficiales (Sudesh et al., 1999), una mayor recurrencia de la queratitis herpética (Wand et al., 1999) y cambios en la densidad endotelial o el espesor corneal (Lass et al., 2001). Lo más significativo es que producen un incremento en la pigmentación de la piel periorbitaria, en el iris y en las pestañas (Kook and Lee, 2000). Aun con estos efectos adversos, siguen siendo los tratamientos más empleados actualmente ya que a nivel sistémico no provocan efectos adversos reseñables, excepto en pacientes con predisposición a problemas cardiacos o respiratorios.

2.2.2. BETABLOQUEANTES

El tratamiento mediante la aplicación tópica de bloqueantes β -adrenérgicos, es uno de los más empleados como tratamiento farmacológico del glaucoma. Estos fármacos son capaces de disminuir la producción de humor acuoso a nivel del epitelio ciliar (Coakes and Brubaker, 1978). Aunque son capaces de reducir la PIO entre un 16 y un 25%, no son efectivos en todas las personas y no están libres de efectos adversos,

como severas afecciones cardiovasculares o broncopulmonares, depresión e insomnio (Ehongo and Bremer, 2007, Baker, 2005, Costa et al., 2003).

2.2.3. AGONISTAS SELECTIVOS ADRENÉRGICOS ALFA-2

Los agonistas de los receptores α_2 -adrenérgicos son capaces de reducir la PIO, tanto a través de una reducción en la producción del humor acuoso a corto plazo, al afectar a la permeabilidad de la barrera hematoacuosa (Gharagozloo et al., 1988), como a largo plazo a través de un aumento en la facilidad del drenaje por la vía convencional, mediante una reducción en la presión de las venas episclerales (Toris et al., 1995b), y por la vía uveoescleral (Toris et al., 1995a). En cuanto a los efectos adversos causados por dichos fármacos, a nivel ocular, provocan conjuntivitis folicular (Butler et al., 1995) y en menor medida midriasis y blanqueamiento conjuntival (Jampel et al., 1988), y a nivel sistémico, los efectos adversos característicos son la fatiga, el dolor de cabeza, la sequedad oral, hipotensión y somnolencia (Novack et al., 2002).

2.2.4. AGONISTAS COLINÉRGICOS

Los agentes colinérgicos están indicados en todos los tipos de glaucoma de ángulo abierto en los que el sistema de drenaje está funcionalmente intacto. Actúan a través de la estimulación de los receptores muscarínicos presentes en el músculo ciliar y en el esfínter del iris, disminuyendo la PIO mediante la contracción del músculo ciliar que provoca una tracción en el espolón escleral cambiando la configuración de la malla trabecular y del canal de Schlemm, aumentando así el flujo a través de la vía convencional (Nietgen et al., 1999). Los efectos adversos sistémicos van desde náuseas, vómitos, diarreas, dolor abdominal, hasta broncoespasmos, bloqueo auriculoventricular y disfunciones cognitivas (Reyes et al., 1987). A nivel ocular los efectos más reseñables son la miosis, que puede provocar alteraciones en el campo

visual y espasmos en la acomodación, hiperemia conjuntival y un mayor riesgo de desarrollar cataratas (Webster et al., 1993).

2.2.5. INHIBIDORES DE ANHIDRASA CARBÓNICA

Los inhibidores de la enzima anhidrasa carbónica son potentes reductores de la PIO, y se emplean en el tratamiento para el glaucoma de ángulo abierto principalmente cuando están contraindicados los β -bloqueantes (Talluto et al., 1997). Los efectos adversos asociados al tratamiento con los inhibidores de la anhidrasa carbónica a nivel ocular no son graves (irritación, emborronamiento transitorio, y reacciones de hipersensibilidad), tan sólo en casos puntuales pueden provocar edemas corneales (Konowal et al., 1999, Barnebey and Kwok, 2000). Aunque a nivel sistémico estos tratamientos crean acidosis metabólica y trombocitopenia, por lo que no son recomendables en pacientes con disfunciones hepáticas, renales, adrenocorticales u obstrucciones pulmonares severas (Cantor, 1989, Block and Rostand, 1978).

2.2.6. NUEVAS OPCIONES DE TRATAMIENTO

Debido a los efectos adversos antes mencionados se siguen buscando nuevas opciones de tratamiento para el glaucoma. Además, se ha demostrado que, por ejemplo, entre un 10% y un 15% de pacientes no responden a latanoprost, uno de los tratamientos para el glaucoma más usado (Scherer, 2002).

Entre los nuevos grupos de tratamiento podemos encontrar los modificadores del citoesqueleto como los inhibidores de Rho quinasa (ROCK) que provocan una rotura de la polimerización de la actina, incrementando los espacios en la malla trabecular y facilitando el drenaje del HA (Renieri et al., 2008, Rosenthal et al., 2005, Thieme et al., 2000, Rao et al., 2001, Fukiage et al., 2001, Rao and Epstein, 2007, Chen et al., 2011);

o los vasodilatadores como el óxido nítrico, que pueden ser usados como antagonistas para aumentar el drenaje convencional del HA (Gabelt et al., 2011, Stamer et al., 2011).

Otro de los nuevos tratamientos del glaucoma son los nucleótidos y dinucleótidos, agonistas y antagonistas purinérgicos, también han sido propuestos como tratamientos eficaces para reducir la PIO, como se ha demostrado con el Ap_4A en el tratamiento continuado de ratones glaucomatosos DBA/2J (Guzman-Aranguez et al., 2013, Fonseca et al., 2017).

Finalmente, nos encontramos con la melatonina y sus derivados, que se han mostrado eficaces en el tratamiento del glaucoma tanto en animales (Martinez-Aguila et al., 2016, Crooke et al., 2012, Martinez-Aguila et al., 2013, Serle et al., 2004, Alarma-Estrany et al., 2011, Crooke et al., 2013) como en humanos (Pescosolido et al., 2015, Ismail and Mowafi, 2009), como se podrá ver más adelante en esta tesis.

3. MODELOS ANIMALES DE GLAUCOMA

Como se ha comentado anteriormente, todos los tratamientos para el glaucoma se centran en la bajada de la PIO para de esta forma, prevenir la perdida de células ganglionares retinianas. Para ello, la inducción experimental de la elevación de la PIO es una estrategia ampliamente usada para investigar los cambios producidos por el glaucoma y la eficacia de los nuevos medicamentos. Estos modelos obstruyen la salida de humor acuoso a través de la malla trabecular, provocando el aumento de la PIO.

Uno de los modelos más usados es la rata con una presión moderadamente elevada y crónica. Este modelo se basa en la obstrucción de las venas responsables del drenaje, tanto por microinyecciones de solución hipertónica (Morrison et al., 1997), o por cauterización de las venas episclerales (Shareef et al., 1995). En ambos casos el resultado es la bajada de la salida del HA. Estas ratas muestran un incremento de

PIO de alrededor de un 60% sobre los controles, mantenidos durante 6 meses en el 80% de los casos.

Además, se ha demostrado la presencia de la óxido nítrico sintasa (ONS-2) en el nervio óptico y la pérdida de sus células ganglionares retinianas (Sawada and Neufeld, 1999, Shareef et al., 1999).

Entre las desventajas de este modelo, se pueden destacar el coste del equipo y un entrenamiento especializado. Además, varía la elevación de PIO producida y su duración, y pueden aparecer problemas oculares asociados, como inflamación ocular (Aihara et al., 2003b) y edema corneal (Fu and Sretavan, 2010).

Existen otros modelos de rata hipertensa, donde la bajada del drenaje se consigue con inyecciones semanales de ácido hialurónico en la cámara anterior (Benozzi et al., 2002, Moreno et al., 2005), o por inyección de microesferas de látex con o sin hidroximetilcelulosa (Urcola et al., 2006, Sappington et al., 2010) o con administración de antígeno S (Mermoud et al., 1994). En el método del ácido hialurónico se ha observado un descenso del sistema de defensa antioxidante, tanto de la ruta nitrérgica retiniana como la mediada por el glutamato (Belforte et al., 2007, Moreno et al., 2004).

Existen a su vez otros modelos que inducen daño específico de las células ganglionares de la retina sin alteración de la PIO a través de daños mecánico de nervio óptico (Vidal-Sanz et al., 1987, Vidal-Sanz et al., 1991) o mediante agentes tóxicos (Li et al., 1999).

Otros modelos animales hipertensos se consiguen cortando transversalmente el nervio óptico de ratas (Kilic et al., 2002), por inyección subconjuntival de una solución al 5% de fenol en aceite de almendras, (Luntz, 1966), con inyecciones en cámara posterior de α -quimiotripsina (Triviño Casado, 1984), con inyecciones de diferentes sustancias en la cámara anterior como microesferas (Weber and Zelenak, 2001, Sappington et al.,

2010, Frankfort et al., 2013, Samsel et al., 2011, Bunker et al., 2015, Morgan and Tribble, 2015), en combinación con hidroxipropilmetilcelulosa (Urcola et al., 2006) o en combinación con ácido hialurónico (Cone et al., 2012), que conducen a un bloqueo del canal de la malla trabecular y la consecuente elevación de la PIO. Alternativamente, otros compuestos inyectados en cámara anterior como son la metilcelulosa al 2% o agentes viscoelásticos, pueden producir un aumento de la PIO (Manni et al., 1996, Torngren et al., 2000).

Con la inyección de condroitin sulfato a ratas, se ha conseguido obtener otro modelo más de glaucoma (Belforte et al., 2010). Estas ratas presentan una alteración importante del sistema visual no relacionado directamente con la imagen (de Zavalia et al., 2011). Presentan una reducción marcada en el número de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles y un reflejo pupilar aferente alterado (de Zavalia et al., 2011).

Se ha conseguido un aumento de la PIO con la aplicación tópica, sistémica o periocular de esteroides (Razali et al., 2015, Overby et al., 2014). En estos modelos el aumento de presión está asociado con un incremento del grosor de la malla trabecular, del estrés oxidativo retiniano y con pérdida de células retinianas (Razali et al., 2015).

Como modelo animal superior se encuentra el mono glaucomatoso (Serle et al., 2004). Esta hipertensión se induce con un tratamiento repetido en mitad de la malla trabecular con láser de argón o fotocoagulador (Serle et al., 2004).

Uno de los modelos animales ampliamente usado para el estudio de fármacos anti-glaucomatosos es el conejo de Nueva Zelanda, siendo sugerido como método de detección rápida de compuestos debido a que puede obviar algunas desventajas de los métodos usados para inducir hipertensión ocular (Rowland et al., 1981).

3.1. CONDICIÓN DE HIPERTENSIÓN TRANSITORIA

Dados las complicaciones que se encuentran al tratar de inducir hipertensión ocular permanente, se han probado otros métodos para inducir la condición de hipertensión ocular durante un tiempo determinado.

3.1.1. POSICIÓN DE TRENDELEMBURG

Los conejos o casi cualquier otro animal, como ratones o ratas, pueden ser colocados en un cepo con la cabeza abajo en un ángulo de 80° con la horizontal. Esta posición es llamada posición de Trendelenburg (Meyer, 1885) y produce un estasis venoso gravitacional que dificulta el drenaje del humor acuoso y aumenta la PIO (Greaves and Perkins, 1951, Langham, 1965). Dado que esta posición es sencilla de realizar y claramente produce un incremento de la PIO, puede ser una manera rápida de comprobar el efecto de nuevo compuestos para tratar la hipertensión y el glaucoma.

3.1.2. OTROS

Otro método desarrollado para proporcionar un aumento transitorio de la PIO consiste en la constricción del globo ocular de rata a través de un lazo ajustable (Joos et al., 2010). Este lazo se inserta anterior al ecuador del ojo, después de la administración de anestesia y permite regular la presión ejercida sobre el ojo hasta alcanzar la PIO deseada. Tiene como ventaja la posibilidad de regulación de la presión y poder realizarlo sobre un único ojo, sin embargo, las medidas deben realizarse bajo anestesia.

3.2. RATÓN DBA/2J

La investigación ocular basada en el estudio de ratones ha ganado fuerza en la última década gracias a su variabilidad genética bien caracterizada, a la capacidad de manipularlos genéticamente, a su uso para los estudios de medicamentos y a su bajo coste económico. Sin embargo, no ha sido hasta hace un par de años cuando los modelos murinos han despuntado por su viabilidad experimental para el estudio del glaucoma. Al contrario que otros modelos de no primates, los ratones poseen malla trabecular lamelar y un canal de Schlemm con vías de drenaje convencional y no convencional (Chen et al., 2008, Lei et al., 2011, Lindsey and Weinreb, 2002). Las diferencias con las vías de drenaje de los primates incluyen un ángulo anterior más cerrado y una malla trabecular posicionada posteriormente con menos haces. Al contrario que los modelos de primates, los ratones no tienen ningún efecto de lavado, lo que los convierte en un modelo único para el estudio del drenaje (Lei et al., 2011). A esto hay que añadirle unos mecanismos de regulación de la producción y drenaje del humor acuoso similares al humano (Aihara et al., 2003a, Lei et al., 2011), así como una respuesta parecida en la respuesta a medicamentos antiglaucomatosos (Boussommier-Calleja et al., 2012).

También se ha visto un daño glaucomatoso dependiente de la edad en los tejidos oculares del ratón, similar al patrón humano (Howell et al., 2008). Esto, unido al hecho de que la anatomía de la vía de drenaje en ratones es bastante similar a la humana, hacen de los ratones un modelo ideal para el estudio de problemas glaucomatosos (Howell et al., 2008).

Entre los modelos de ratones podemos encontrar ratones deficientes para transportadores de glutamato (Harada et al., 2007), ratones que expresan el gen de la optineurina mutado bajo el promotor de actina (Johnson and Morrison, 2009), así como el ratón DBA/2J.

El ratón DBA/ 2J es usado como uno de los modelos de glaucoma más comunes y ha proporcionado números hallazgos sobre la enfermedad. Es un modelo de glaucoma pigmentario espontaneo que conduce a una obstrucción de la malla trabecular y una elevación de la PIO asincrónica debido a dos mutaciones que causan una atrofia estromal del iris (gen *Tryp 1*) y una dispersión pigmentaria (gen *Gpnmb*) (Anderson et al., 2002). Los cambios en la PIO empiezan a los 6 meses y las hembras parecen estar afectadas a una edad más temprana que los machos. Sin embargo, la elevación de la PIO es asimétrica y hace que el mismo ratón pueda tener PIO alta en un ojo y el contralateral con una PIO normal. Además hay un amplio rango en el tiempo en el que los animales empiezan a tener una PIO alta (John et al., 1998).

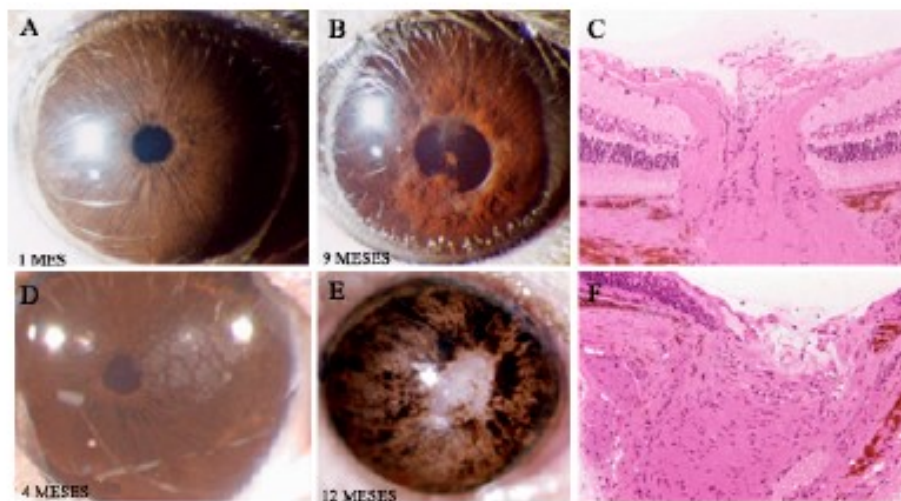


Figura 1.4. Evolución de la dispersión del pigmento del iris y atrofia del estroma del iris en función del tiempo en el animal glaucomatoso DBA/2J.

A, B, D y E) Imágenes de la evolución de la atrofia iridiana de los ratones DBA/2J con el avance del tiempo. **C y F)** Secciones de retina de DBA/2J teñidas con hemotixilina-eosina mostrando el adelgazamiento de la retina central del ratón. Modificado de (Anderson et al., 2006)

ESTRUCTURAS	HUMANO	CONEJO	RATÓN
GLOBO OCULAR			
Longitud axial	24.44 ± 1.03 mm (Augusteyn <i>et al.</i> , 2012)	15.12 ± 0.51 mm (Bozkir <i>et al.</i> , 1997)	3069 ± 43 µm - 3827 ± 43 µm (Chou <i>et al.</i> , 2011)
CÓRNEA			
Diámetro horizontal	11.5 - 12 mm (Rufer <i>et al.</i> , 2005; Knupp <i>et al.</i> , 2009)	13.41 ± 0.34 mm (Bozkir <i>et al.</i> , 1997)	Sin diferencias entre el diámetro horizontal y el vertical (Henriksson <i>et al.</i> , 2009)
Diámetro vertical	11 mm (Rufer <i>et al.</i> , 2005; Knupp <i>et al.</i> , 2009)	13.02 ± 0.30 mm (Bozkir <i>et al.</i> , 1997)	Sin diferencias entre el diámetro horizontal y el vertical (Henriksson <i>et al.</i> , 2009)
Radio de curvatura anterior	7.8 mm (Courville <i>et al.</i> , 2004)	7.26 ± 0.26 mm (Bozkir <i>et al.</i> , 1997)	1301 ± 76 µm - 1474 ± 40 µm (Chou <i>et al.</i> , 2011)
Espesor epitelial	50 - 60 µm (Knupp <i>et al.</i> , 2009)	26.1 µm - 42.8 µm (Goes <i>et al.</i> , 2008)	Espesor epitelial central: (37.12 ± 2.3 µm - 51 µm) Espesor epitelial periférico: (17.86 ± 6.6 µm - 22.39 ± 2.5 µm) (Zhang <i>et al.</i> , 1996; Henriksson <i>et al.</i> , 2009)
Espesor corneal central	535 ± 20 µm (Doughty <i>et al.</i> , 2000)	(341 ± 14 µm - 404 ± 12 µm) (Riau <i>et al.</i> , 2012)	106.00 µm ± 3.45 µm - 170 µm (Zhang <i>et al.</i> , 1996; Schulz <i>et al.</i> , 2003; Henriksson <i>et al.</i> , 2009; Lively <i>et al.</i> , 2010)
Espesor corneal periférico	657 ± 71 µm (Doughty <i>et al.</i> , 2000)	450 µm (Davis, 1929)	68.00 ± 6.8 µm - 90.55 ± 1.9 µm (Henriksson <i>et al.</i> , 2009)
Endotelio corneal	4 - 6 µm (Knupp <i>et al.</i> , 2009)	2.6 µm (Doughty <i>et al.</i> , 1997)	2.15 µm (Henriksson <i>et al.</i> , 2009)

Tabla I.1. Estudio comparativo de algunos de los parámetros oculares en humano, conejo y ratón.

4. COMPUESTOS MELATONINÉRGICOS

4.1. BIOSÍNTESIS DE MELATONINA

La melatonina, o N-acetil-5-metoxitriptamina, es una indolamina sintetizada a partir de la serotonina por la acción consecutiva de la aralkilamino-N-acetiltransferasa (AANAT) y la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) (Fig. I.4) (Axelrod, 1974). Se aisló inicialmente a partir de glándulas pineales bovinas en 1958 (Lerner, 1958) y se creía

que era producida exclusivamente en esa localización cerebral. Más tarde se identificaron las enzimas mencionadas anteriormente, AANAT y HIOMT, en la retina y el cerebelo (Cardinali and Rosner, 1971, Bubenik et al., 1974), así como en muchos tejidos y órganos periféricos (Stefulj et al., 2001), lo que hizo pensar en que la producción de melatonina no era exclusiva de la glándula pineal.

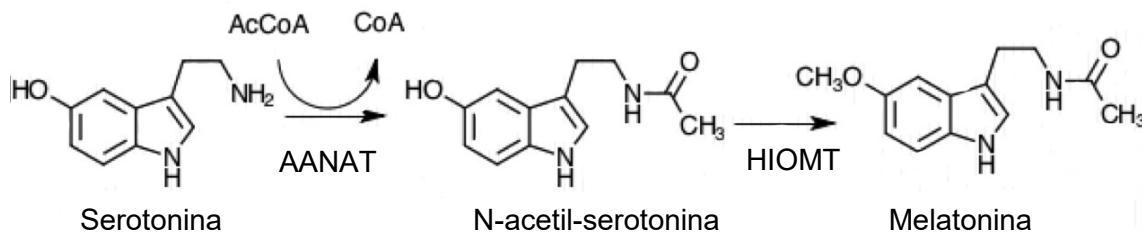


Figura I.4. Representación esquemática de la transformación de serotonina a melatonina.

La melatonina está presente en todos los organismos tanto animales como vegetales, incluyendo cianobacterias, algas y tripanosomas (Poeggeler and Hardeland, 1994, Macias et al., 1999), interviniendo en un gran número de procesos, lo que demuestra su gran importancia para la fisiología celular.

4.2. SECRECIÓN DE MELATONINA

La melatonina muestra una alta solubilidad lipídica, lo que facilita el paso a través de las membranas celulares (Pardridge and Mietus, 1980). Después de la liberación en la circulación, puede acceder a varios fluidos, tejidos y compartimentos celulares (saliva, orina, fluido cerebroespinal folículos preovulatorios, semen, líquido amniótico y leche). Dado que la melatonina no se almacena en la glándula pineal, los niveles de hormona en el plasma reflejan fielmente la actividad de la pineal (Reiter, 1991). La secreción ocurre durante la noche, con unos niveles máximos en plasma sobre las 03:00 – 04:00 a.m., mientras que los niveles diurnos son indetectables, o bajos en sujetos descansados. Este patrón permanece constante tanto en especies diurnas y nocturnas expuestas a diferentes fotoperiodos (Reiter, 1991, Arendt, 1998).

Las concentraciones de melatonina en plasma muestran una amplia heterogeneidad inter-sujetos. Sin embargo, los niveles son muy reproducibles día tras día para el mismo sujeto, lo que representa uno de los ritmos circadianos más robustos. Esto proporciona una buena evaluación de la secreción de la melatonina.

Con la edad, el ritmo de producción de la melatonina se modera progresivamente, con una tendencia a aumentar las fases, y puede llegar a detenerse en edades avanzadas (Iguichi et al., 1982). Este descenso en la secreción está reforzado en personas mayores con insomnio, lo que sirve de base para el tratamiento del insomnio con esta hormona (Haimov et al., 1994).

4.3. METABOLISMO DE MELATONINA

En el cerebro, la melatonina es oxidada a N₁-acetil-N₂-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), el cual se produce tras la reacción de melatonina con especies de oxígeno reactivas (Hirata et al., 1974, Cardinali and Pevet, 1998, Cardinali, 1981). La AFMK muestra una capacidad antioxidante in vitro y es el compuesto relacionado con melatonina implicado en el proceso por el cual la melatonina y sus metabolitos secuestra satisfactoriamente las especies de oxígeno reactivas, referidos como la cascada de secuestro de radicales libres.

El hígado es el encargado de degradar la melatonina, transformando más del 90% de la melatonina circulante. La melatonina es primero hidroxilada a 6-hidroximelatonina por el citocromo CYP1A2. Existen amplias diferencias entre individuos (De 10 a 200 veces) en la actividad de CYP1A2 (Gunes and Dahl, 2008). La 6-hidroximelatonina es excretada en la orina como sulfato y, en menor medida, como conjugados glucurónicos (Francis et al., 1987). Este último compuesto es excretado de forma casi paralela al perfil de melatonina en el plasma (Arendt et al., 1985).

4.4. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE MELATONINA

El ciclo de la melatonina es generado por un reloj endógeno localizado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, como otros ciclos circadianos en mamíferos (bebida y alimento, ciclos sueño-vigilia, temperatura, cortisol, etc.) (Cardinali and Pevet, 1998). Los datos han sido descritos en animales, principalmente roedores y monos, y extendido a humanos (Moore, 1992, Edgar et al., 1993). Esto ha sido confirmado por las observaciones clínicas (Cohen and Albers, 1991).

El ciclo de luz/oscuridad es el principal sincronizador del sistema que regula la secreción de melatonina. La información lumínica es transmitida al sistema central a través de las fibras retino-hipotalámicas. Durante el día, en presencia de luz, la salida del tracto retino-hipotalámico inhibe la síntesis de melatonina. Por otro lado, una luz artificial con suficiente intensidad y duración administrada en oscuridad suprime la producción de melatonina (Lewy et al., 1980). Una intensidad de luz de 2000-2500 lx durante 2 horas (02:00 - 04:00 a.m.) suprime por completo la secreción de melatonina, mientras que luces de intensidades domésticas (50 – 300 lx) tienen un efecto más moderado (Bojkowski et al., 1987). Además, después de la exposición a la luz durante varias noches consecutivas, la secreción de melatonina elude el efecto inhibitorio y progresivamente se desfasa hacia la mañana. Como rutina se utilizan luces brillantes de espectro completo, pero las longitudes de onda más efectivas están en el rango de 446-477 nm (Luz azul) (Brainard et al., 2001, Thapan et al., 2001). Debido a que los espectros de acción obtenidos de las curvas de respuesta a la irradiación no corresponden con espectros de acción escotópicos o fotópicos, se postulan nuevos receptores como los encargados de esta supresión. Existen células ganglionares de la retina especializadas, conocidas como células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC), que contienen melanopsina, y que son las encargadas de regular el ciclo circadiano (Berson et al., 2002). Es más, este sistema manda información lumínica también a áreas del cerebro involucradas en la respuesta a la luz no

directamente relacionadas con la imagen, como es la constricción pupilar y la inducción del sueño (Hughes et al., 2012).

El recorrido que sigue la información va desde la retina a la glándula pineal pasando a través del ganglio cervical superior. El principal neurotransmisor que regula la glándula pineal es la noradrenalina, la cual es liberada durante la noche, en respuesta a señales estimuladoras generadas en el núcleo supraquiasmático.

La secreción nocturna de melatonina es suprimida por antagonistas β_1 adrenérgicos, así como por la clonidina, un antagonista α_2 , y la α -metil-para-tirosina, las cuales reducen la síntesis de catecolaminas presinápticas (Arendt et al., 1985).

4.5. ACCIONES DE LA MELATONINA

Además de la acción de la regulación circadiana de los ciclos de luz-oscuridad (Bartness and Goldman, 1989, Hardeland et al., 2012) y estacionales (Arendt, 1998, Kaminski-Hartenthaler et al., 2015), la melatonina circulatoria colabora en la homeostasis, protegiendo a las células frente al estrés oxidativo. Contrarresta los daños por radicales libres, actuando de formas distintas según su producción, ejerciendo una acción antioxidante, si se produce en la glándula pineal, y como secuestrador de radicales libres si se produce extrapinealmente (Tan, 1993, Reiter et al., 2009, Bonnefont-Rousselot et al., 2011). Asimismo, la melatonina modula la transcripción de genes antioxidantes a través de la activación de los receptores MT_1/MT_2 (Rodriguez et al., 2004). Esta activación de receptores también sirve para regular otras vías de señalización que incluyen múltiples procesos como la regulación cronobiológica, así como respuestas celulares a diferentes daños, incluida la apoptosis (Goldsmith and Bell-Pedersen, 2013, Luchetti et al., 2010, Jarzynka et al., 2009, Luchetti et al., 2009, Wongprayoon and Govitrapong, 2017, Ramos et al., 2017). También regula, a través de los complejos de calcio-calmodulina, los genes de transcripción de enzimas antioxidantes (Tomas-Zapico et al., 2006).

Se ha descrito la participación de la melatonina como inmunomodulador (Carrillo-Vico et al., 2005), antidepresivo (Beck-Friis et al., 1985, Hansen et al., 2014, Quera Salva et al., 2011, Kripke et al., 2015, Pringle et al., 2015), para el tratamiento de los desórdenes primarios de sueño (Ferracioli-Oda et al., 2013), como tratamiento ansiolítico preoperatorio (Caumo et al., 2007, Khezri et al., 2013, Yousaf et al., 2010), en la regulación de la maduración de los órganos sexuales (Kumanov et al., 2005, Lewis et al., 2006), en el desarrollo embrionario del ojo y corazón (Nogueira and Sampaio, 2017, Sampaio Lde, 2008, Sampaio Lde, 2009), como modulador de la presión arterial, (Sewerynek, 2002, Pandi-Perumal et al., 2016), como regulador de la expresión de algunos genes, incluidos los receptores alfa y beta adrenérgicos y la adenilato ciclasa (Crooke et al., 2013, Crooke et al., 2011), y como regulador de la presión intraocular (Pintor et al., 2003, Martinez-Aguila et al., 2016).

5. RECEPTORES DE MELATONINA

Además de su actividad biológica mediada por receptores específicos de membrana, la melatonina interactúa con receptores nucleares y proteínas intracelulares, como la calmodulina o las proteínas asociadas a tubulina y demuestra efectos antioxidantes directos o indirectos, los cuales participan en muchas funciones generales (Cardinali et al., 1997).

La nomenclatura oficial para los receptores de membrana de melatonina ha sido recientemente revisada por la Unión Internacional Farmacológica (IUPHARM) (Dubocovich et al., 2010). Dos subtipos de receptores mamíferos han sido clonados, los subtipos MT₁ y MT₂, también denominados Mel1a y Mel1b. Ambos subtipos son miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembrana y muestran una alta homología a nivel de aminoácidos (sobre un 55% total y un 70% en los dominios transmembrana). Es más, comparten secuencias cortas específicas de aminoácidos, lo que sugiere que representan una subfamilia específica.

Existe otro tipo de receptor de melatonina, denominado MT₃, el cual fue descrito inicialmente por Duncan (Duncan et al., 1988). Presenta una afinidad más baja por la melatonina que los otros dos receptores (5-50 nM frente a menos de 1 nM para MT₁ y MT₂) (Molinari et al., 1996). Presenta como un ligando específico, el 5-Metoxi-carbonilamino-N-Acetilriptamina, o 5-MCA-NAT, el cual presenta afinidad en el rango nanomolar para este receptor, mientras que tiene una afinidad solo micromolar para los receptores MT₁ y MT₂ (Molinari et al., 1996). Hasta la fecha, no se ha conseguido clonar este receptor.

Por otra parte, el receptor GPR50, fue clonado en 1996 y clasificado como miembro de la subfamilia de receptores de melatonina debido a su alta homología (45%) con MT₁ y MT₂ a nivel de aminoácidos y debido a la presencia de patrones características de esta subfamilia (Reppert et al., 1996).

Este gen pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G de las rodopsinas (Clase-A) (Fredriksson et al., 2003). La melatonina no puede unirse a este receptor y sigue considerándose un receptor huérfano sin ligando conocido (Reppert et al., 1996, Li et al., 2013). Hasta la fecha sólo ha sido encontrado en ovejas, roedores y humano.

Entre las funciones que parece tener este receptor destacan su relación con el metabolismo energético (Ivanova et al., 2008), con alteraciones lipídicas en humanos (Bhattacharyya et al., 2006), y su posible interacción con problemas mentales como enfermedades afectivas bipolares o esquizofrenia, normalmente afectando más a las mujeres (Thomson et al., 2005) debido a su localización en el cromosoma X (Xq28).

Sin embargo, una de las interacciones más características es la de poder formar heterodímeros con los receptores MT₁ y MT₂ tanto *in vivo* (Levoye et al., 2006) como *in vitro* (Jockers et al., 2008). Como resultado de esta dimerización, la actividad del receptor MT₂ no varía, mientras que con el receptor MT₁ queda inhibida. Sin embargo,

la delección del extremo largo C-terminal del receptor GPR50 suprime el efecto inhibitorio en el receptor MT₁ sin afectar a la dimerización (Levoye et al., 2006).

Otra teoría sobre este receptor indica que podría ser el ortólogo del receptor Mel_{1C} (Dufourny et al., 2008). Este último receptor fue clonado a partir de los melanóforos inmortalizados de *Xenopus laevis*, y sólo se encuentra expresado en especies no mamíferas (aves, pollo y peces) (Ebisawa et al., 1994).

Por ultimo nos encontramos con otra familia de receptores huérfanos pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares RZR/ROR que tienen como ligando natural a la melatonina y que están relacionados con el efecto inmunomodulador de la melatonina (Carrillo-Vico et al., 2003).

Existe otro factor para tener en cuenta con los receptores de melatonina ya que, como se ha comentado anteriormente, la actividad de los receptores puede no sólo depender de la variedad existente de asociaciones a proteínas G, sino también a las asociaciones de estos receptores en forma de homómeros o heterómeros ya que dichas interacciones pueden modificar los mecanismos de transducción de señales.

La capacidad de oligomerización (tanto homómeros como heterómeros) de estos receptores es bien conocida, y se ha demostrado la formación de estas estructuras en células HEK239T transfectadas con receptores MT₁ y MT₂ humanos (Ayoub et al., 2002), llegando a sugerirse que el receptor MT₂ existe preponderantemente en forma de heterómero MT₁/MT₂ (Ayoub et al., 2004).

Otra posibilidad que destacar es la posibilidad de la formación de heterómeros de receptores de melatonina con otras familias de receptores, como la existencia de heterómeros entre el receptor MT₂ y el 5-HT_{2C} (Kamal et al., 2015). Este heterómero es de relevancia ya que existe un análogo de la melatonina llamado agomelatina (N [2-(7-metoxi-1-nafetil) etil]acetamida) que tiene una alta afinidad por los receptores MT₁ y MT₂ (Conway et al., 2000) y a la vez es un inhibidor no selectivo del receptor de serotonina 5-HT_{2C} (Millan et al., 2003). Esta interacción implica un perfil de acción distintivo de este

compuesto, que además es usado actualmente para el tratamiento de la depresión (De Berardis et al., 2011) con el nombre comercial de Valdoxan®, Melitor® y Thymanax®.

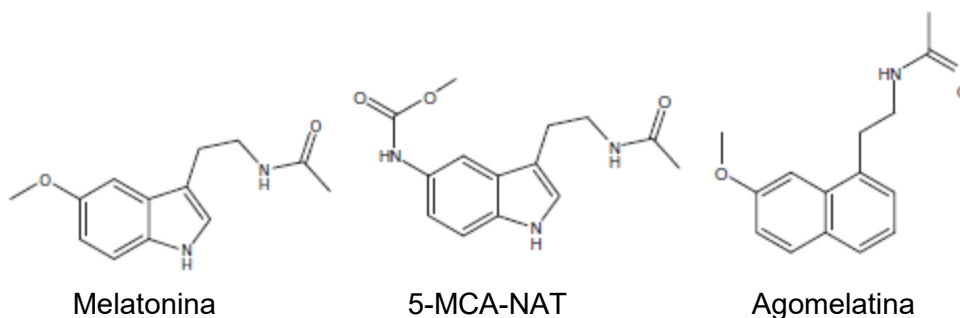


Figura I.5. Representación esquemática la melatonina y sus análogos 5-MCA-NAT y agomelatina.

5.1. LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES DE MELATONINA

Se ha confirmado la presencia de receptores de melatonina en numerosas partes del cuerpo siendo especialmente relevantes en el sistema nervioso central.

Los receptores MT_1 están expresados en el cerebro, sistema cardiovascular (incluidos los vasos sanguíneos periféricos, la aorta y el corazón), sistema inmune, testículos, ovarios, piel, hígado, riñón, córtex adrenal, placenta, pecho, páncreas y bazo (Dubocovich and Markowska, 2005, Fischer et al., 2008, Pandi-Perumal et al., 2008, Slominski et al., 2005, Slominski et al., 2008, Schlabritz-Loutsevitch et al., 2003). En el cerebro, se encuentra predominantemente en el hipotálamo, cerebelo, hipocampo, pituitaria, *substancia nigra* y el área tegmental ventral (Pandi-Perumal et al., 2008, Balik et al., 2004)

El receptor MT_2 se ha encontrado en el sistema inmune, cerebro (hipotálamo, núcleo supraquiasmático), pituitaria, vasos sanguíneos, testículos, útero, riñón, tracto gastrointestinal, páncreas, glándulas mamarias, tejido adiposo y en la piel (Dubocovich and Markowska, 2005, Reppert et al., 1995, Roca et al., 1996, Slominski et al., 2005, Balik et al., 2004, Picinato et al., 2008, Schlabritz-Loutsevitch et al., 2003).

En cuanto al GPR50, se ha detectado en regiones del hipotálamo y pituitaria, incluyendo la *pars tuberalis* (Reppert et al., 1996, Drew et al., 1998), el hipotálamo dorsomedial (Ivanova et al., 2008) y en la capa de células endodimales del tercer ventrículo (Barrett et al., 2006).

5.1.1. LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES DE MELATONINA EN EL OJO

Si se observa en la expresión de los receptores de melatonina en el ojo, se localizan los mismos en casi todas las estructuras oculares.

En la córnea se han identificado los receptores MT₁ y MT₂ en peces, ranas, pájaros y conejos (Wiechmann and Rada, 2003, Wiechmann et al., 2004, Rada and Wiechmann, 2006), así como en humanos (Meyer et al., 2002). Estos receptores parecen estar relacionados con el proceso de regeneración epitelial (Buffa et al., 1993, Wiechmann and Rada, 2003, Pintor et al., 2005, Crooke et al., 2015).

Estos mismos receptores han sido también identificados en iris y cuerpo ciliar de conejos (Osborne and Chidlow, 1994) y en humano (MT₂) (Roberts et al., 2000). Se ha detectado a su vez, otro subtipo de receptor localizado en la superficie basolateral de las células del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar de *Xenopus Laevis*, probablemente Mel1c, el ortólogo del receptor GPR50. Este receptor no está presente en la capa pigmentada del cuerpo ciliar ni en el epitelio del iris.

Estos receptores están implicados en la regulación de la PIO (Samples et al., 1988, Pintor et al., 2001, Pintor et al., 2003, Martinez-Aguila et al., 2013, Martinez-Aguila et al., 2016).

En el cristalino se han detectado bandas de inmunoreactividad en *Western blots* de membranas celulares de las fibras del cristalino, así como un marcado a través del mismo (Wiechmann et al., 2004). La principal función de la melatonina en el cristalino es actuar como antioxidante (Bardak et al., 2000) y regular el crecimiento o función de esta estructura ocular (Wiechmann et al., 2004).

Embrionariamente, la retina es una extensión del prosencéfalo y por lo tanto presenta similitudes con el cerebro. La retina presenta una secreción de melatonina propia que posee un ritmo circadiano (Pang et al., 1980, Wiechmann, 1986, Cahill and Besharse, 1992), al igual que ocurre en la glándula pineal y comparte muchas similitudes, incluidos fotorreceptores sensibles a la luz (Vigh and Vigh-Teichmann, 1981).

A su vez, se han identificado receptores de melatonina en muchas zonas de la retina, aunque en la retina de los humanos, el ARNm del receptor MT₂ está expresado en niveles más altos que el del MT₁ (Reppert et al., 1995)

En los fotorreceptores se ha localizado el receptor MT₁ en humanos (Meyer et al., 2002, Scher et al., 2002, Savaskan et al., 2002), ranas (Wiechmann and Smith, 2001), y en pollos (Natesan and Cassone, 2002). Los receptores MT₂ y GPR50 han sido localizados en ranas (Wiechmann and Rada, 2003, Wiechmann et al., 2004, Wiechmann and Sherry, 2012), y pollos (Natesan and Cassone, 2002).

Los receptores MT₁ y MT₂ también se han descubierto en células horizontales de la capa plexiforme interna de humanos, monos, ratas y carpas (Fujieda et al., 1999, Fujieda et al., 2000, Scher et al., 2002), pero no colocalizan en el mismo tipo de células, lo que sugiere una separación de poblaciones de neuronas que expresan uno u otro tipo de receptor (Wiechmann and Sherry, 2012).

En ranas se han encontrado los 3 receptores, MT₁, MT₂ y GPR50 en células horizontales (Wiechmann and Rada, 2003, Wiechmann et al., 2004, Wiechmann and Sherry, 2012), así como en pollos han sido localizados en células ganglionares (Natesan and Cassone, 2002).

Por otro lado, se han encontrado heterómeros MT₁/MT₂ en fotorreceptores que muestran un papel clave mejorar de la sensibilidad lumínica durante la noche (Baba et al., 2013)

La existencia de tantos receptores y en una familia amplia de especies, indica la importancia de la melatonina en el globo ocular. Ésta, participa en muchas funciones, como la modulación de la liberación de dopamina en las neuronas de conejo (Dubocovich, 1983), en la regulación de movimientos retinomotores en vertebrados inferiores (Pierce and Besharse, 1985), y en el ajuste de la sensibilidad a la luz de las células horizontales en salamandras (Wiechmann et al., 1988) y median en la regeneración de los discos externos de los fotorreceptores en ratas (White and Fisher, 1989).

Se ha sugerido que los receptores MT₁ y MT₂ están relacionados con los cambios relacionados con la edad (Scher et al., 2002). Se ha relacionado el descenso fisiológico en los niveles de melatonina de personas mayores con el inicio de la degeneración macular asociada a la edad (Rosen et al., 2009), sugiriendo la participación de estos receptores en la protección contra esta enfermedad (Bardak et al., 2017, Yi et al., 2005). Hay también evidencias que sugieren que el tratamiento con melatonina previene la vítreo-retinopatía proliferativa (Er et al., 2006).

Se ha encontrado que la expresión de los receptores de melatonina están alterados en pacientes con Alzheimer, estando el receptor MT₁ sobreexpresado y el receptor MT₂ disminuido (Savaskan et al., 2002, Savaskan et al., 2007),

Otra indicación del posible papel de la melatonina en las patologías relacionadas con la edad es que tanto la síntesis de melatonina retiniana (Pulido and Clifford, 1986, Tosini et al., 2006) como la respuesta a la administración de melatonina exógena (Baba et al., 2012), disminuyen con la edad.

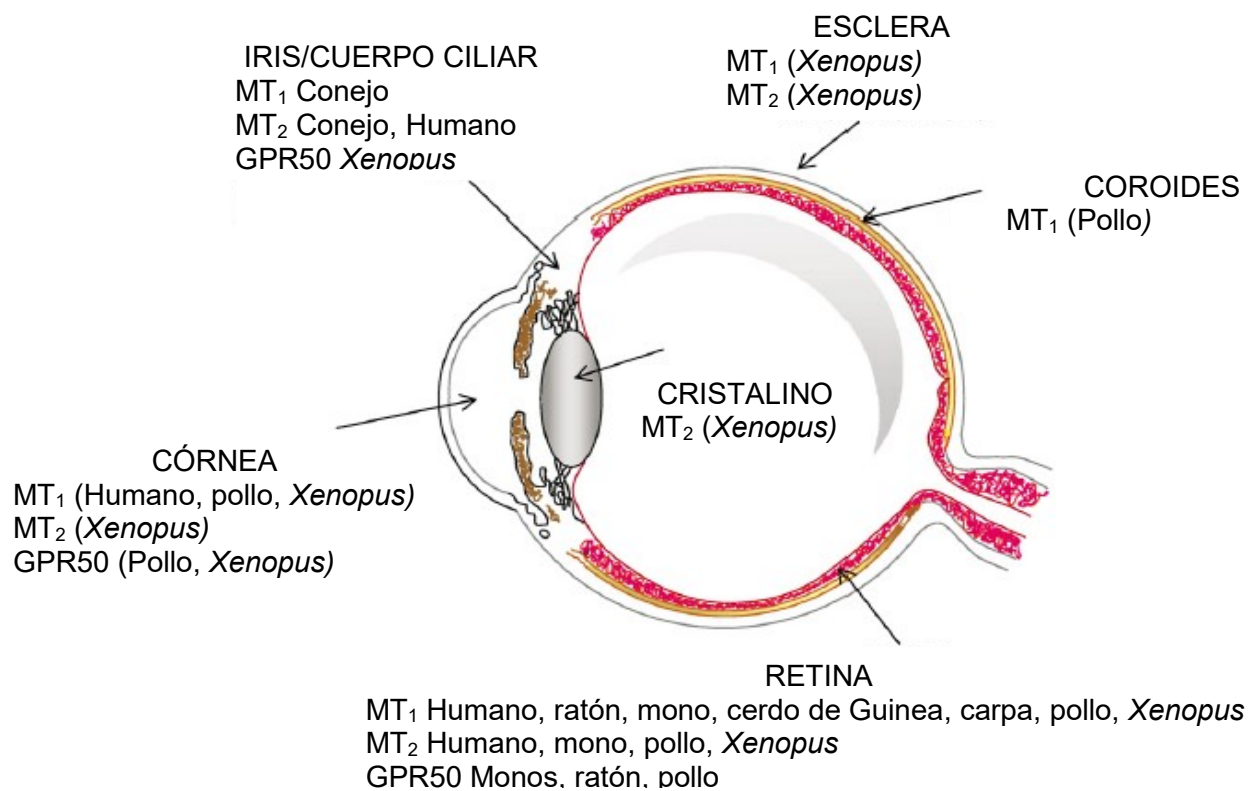


Figura I.6. Localización de los receptores de melatonina en el globo ocular.

La imagen muestra la localización de los receptores de melatonina MT₁, MT₂ y GPR50 en el ojo.

Modificado de (Alarma-Estrany and Pintor, 2007)



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

El glaucoma es una neuropatía óptica progresiva crónica caracterizada por una degeneración de las células ganglionares retinianas y un daño a la cabeza del nervio óptico. De esta forma, hay una pérdida progresiva de campo visual que finalmente puede provocar ceguera (Quigley, 2011).

En 2010, había 4,2 millones de personas con glaucoma en todo el mundo. Esta enfermedad causa un 6,6% (2,1 millones de personas) de los casos de ceguera ($AV < 0,05$) y un 2,2% (4,2 millones de personas) de los casos moderados y severos de discapacidad visual (AV entre 0,05 y 0,33), siendo la mayor causa de ceguera irreversible mundial (Bourne et al., 2016).

El glaucoma presenta, además de la dimensión clínica y social, una vertiente socioeconómica muy importante. Debido a la lenta progresión de la patología y a su cronicidad con el tiempo, estos pacientes requieren de la monitorización del estado de su enfermedad y de un tratamiento médico de por vida (Banga et al., 2015). Alrededor del 8.5% de las visitas a la consulta de oftalmología son debidas al glaucoma (Grub and Rohrbach, 2006), y suponen un gasto de entre 226 y 809 euros al año, dependiendo de lo avanzado de la patología (Lorenz et al., 2013). En España, los costes únicamente derivados del tratamiento médico suponen a cada paciente aproximadamente 650€ anuales (Hommer et al., 2008). Todas estas cifras demuestran la relevancia del glaucoma como un importante problema de salud pública.

Como se ha mencionado en la introducción, una PIO elevada es el mayor factor de riesgo y el único factor de riesgo que puede ser modificado para frenar o retardar la pérdida de visión. Incluso para pacientes que tienen PIO baja pero que pierden visión debido al glaucoma, se les recomienda terapias de control de PIO (Lee and Goldberg, 2011, Webers et al., 2008, Grieshaber and Flammer, 2010, Carta et al., 2012).

Debido a los efectos adversos de los fármacos actuales y a la falta de eficacia para algunos pacientes de los tratamientos actuales (Scherer, 2002), se siguen buscando nuevas opciones de tratamiento para el glaucoma.

Uno de los grupos de nuevos tratamiento más prometedores es la melatonina y sus derivados, que se han mostrado eficaces en el tratamiento del glaucoma tanto en animales (Martinez-Aguila et al., 2016, Crooke et al., 2012, Martinez-Aguila et al., 2013, Serle et al., 2004, Alarma-Estrany et al., 2011, Crooke et al., 2013) como en humanos (Pescosolido et al., 2015, Ismail and Mowafi, 2009).

2. HIPÓTESIS

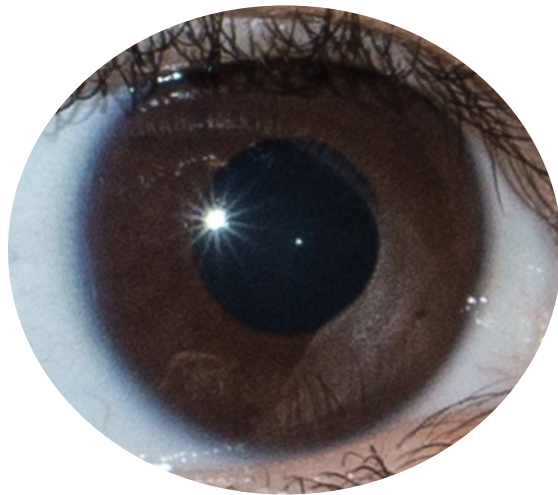
En estudios previos se ha demostrado la eficacia de la melatonina y sus análogos como compuestos prometedores para el tratamiento del glaucoma y como puntos de partida para el desarrollo de nuevos medicamentos. Se ha demostrado que la melatonina y sus derivados reducen la PIO en modelos animales normotensos y que la melatonina puede tener un papel neuroprotector en la retina.

Por lo tanto, la hipótesis de esta Tesis Doctoral es que la melatonina y sus derivados pueden contrarrestar la subida de la PIO en animales glaucomatosos actuando sobre receptores cuya expresión se encuentra alterada como consecuencia de la patología.

3. OBJETIVOS

Todos los antecedentes descritos nos llevaron a plantearnos como objetivo general de esta Tesis Doctoral determinar el papel de los compuestos melatoninérgicos en la patología glaucomatosa. Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de la melatonina y análogos sobre la PIO en conejos albinos de Nueva Zelanda, medidos en condiciones normotensas e hipertensas.
2. Evaluar el efecto de la melatonina y análogos sobre la PIO en ratones C57BL/6J y DBA/2J, realizando una caracterización farmacológica completa de los mismos.
3. Realizar un tratamiento continuado con el compuesto más eficaz para verificar si dicho compuesto puede contrarrestar el aumento de la PIO.
4. Determinar la localización de los receptores de melatonina, así como la variación en el tiempo de la expresión de los genes de melatonina en ambos animales.



MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

A continuación, se describe en las siguientes tablas los reactivos, materiales e instrumentos, medios y tampones, material biológico y los programas y herramientas informáticas que se han empleado para el desarrollo de la tesis.

1.1. REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

A continuación, se muestran los reactivos utilizados, así como las casas comerciales, en base a las diferentes técnicas llevadas a cabo para la experimentación del presente trabajo.

REACTIVO	PROVEEDOR	USO
SpeedTools Total RNA Extraction Kit	Qiagen/Biotools	Biología Molecular
Turbo DNA-free	Ambion	
M-MLV RT reagents, dNTP's	Invitrogen	
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems	
TaqMan® Gene Expression Assays		
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	
LuminoCt® Qpcr Ready Mix		
RNase-Zap		
Syber safe DNA gel stain	Thermo Scientific	
DNA loading		
Gene ruler 100pb		
Gene ruler 1kb		

NDS	Jackson Immunoresearch	Inmunohistoquímica
Tritón X-100	Sigma-Aldrich	
Yoduro de propidio		
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	
Medio de montaje Vectashield	Vector Laboratories, Palex Medical	
Sacarosa	Merck	
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura	Anestesia
Isoflurano (IsoFlo®)	Esteve	
Otros reactivos para análisis (NaCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , HCl,...)	Merck	Varios

Tabla III.1.- Relación de los principales reactivos y compuesto químicos utilizados

Se detalla a continuación los agonistas, antagonistas e inhibidores usados en la experimentación para el tratamiento de los animales.

AGONISTAS, ANTAGONISTAS E INHIBIDORES	PROVEEDOR	USO
Melatonina	Sigma-Aldrich	Agonistas MT ₁ , MT ₂
5-MCA-NAT	Tocris	Agonista MT ₃
Agomelatina	Sigma-Aldrich	Agonista MT ₁ , MT ₂ y antagonista 5-HT _{2C}
Luzindol	Sigma-Aldrich	Antagonista MT ₁ , MT ₂
4-PPDOT	Sigma-Aldrich	Antagonista selectivo MT ₂
Prazosin	Sigma-Aldrich	Antagonista selectivo MT ₃ y α_1

Tabla III.2.- Agonistas, antagonistas e inhibidores

1.2. INSTRUMENTOS Y MATERIALES

A continuación, se muestran la instrumentación necesaria y/o equipamiento especificados dentro de cada una de las metodologías empleadas a lo largo del trabajo de investigación llevado a cabo.

EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES	PROVEEDOR	USO
StepOne Plus Real Time System	Applied Biosystems	Biología Molecular
Termociclador GeneAmp 2400		
Biophotometer Plus 2233	Eppendorf	
Ultra-Turrax T-8 Basic	IKA	
Transiluminador Gel Logic 200 Imagin System	Kodak	
Criostato Leica CM1850	Leica	Inmunohistoquímica
Microscopio Confocal Axiovert 200 M	Zeiss	
Portas y Cubreobjetos	Thermo Scientific	
Módulo Confocal Pascal	Zeiss	
Cámara AxioCam ICc1		
Matrx VIP 3000 Calibrated Vaporized	Midmark	Anestesia
Oxígeno Medicinal	Air liquid	
Tonómetro de rebote TonoLab®	Tiolat-Oy	Presión Intraocular
Tonómetro de rebote TonoVET®		
Centrífuga Labofuge 400	Heraeus	Varios
Centrífuga refrigerada Kubota 6500		
Centrífuga de sobremesa Biofuge® pico		

Tabla III.3.- Equipos, instrumentos y materiales empleados

1.3. MEDIOS Y TAMPONES

Los medios de cultivo, tampones y disoluciones generales se prepararon en agua desionizada de alta calidad y pureza obtenida con un equipo de filtración Milli-Q Water Purification System de Millipore. Las soluciones o muestras que debían mantenerse a 4°C se conservaron en frigoríficos Daewoo, Liebehrr y Bosch. A continuación, se muestra una tabla correspondiente a soluciones generales.

TAMPONES/SOLUCIONES	COMPUESTOS
PBS 10X (pH=7.3)	1.37 mM NaCl; 81 mM Na ₂ HPO ₄ ; 26.8 mM KCl; 14.7 mM KH ₂ PO ₄
PBS 1X (pH=7.3)	10% (v/v) PBS 10X; 90% (v/v) H ₂ O
Solución de sacarosa para incluir tejidos (11%)	10% (V/V) PBS 10X; 11% (m/v) Sacarosa
Solución de sacarosa para incluir tejidos (33%)	10% (V/V) PBS 10X; 33% (m/v) Sacarosa
Tampón de lavados	0.1% (v/v) Tritón X-100; 10% (v/v) PBS 10X
Solución Bloqueo para inmunohistoquímica	90% (v/v) Tampón de lavados (PBS 1X-Tritón X-100 0.1%); 10% (v/v) Suero (NDS)
Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (pH=8.3)	40 mM Tris-base, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA

Tabla III.4.- Medios y tampones

1.4. MATERIAL BIOLÓGICO. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Durante la realización de la presente tesis se ha utilizado como primer modelo experimental el conejo albino de la raza Nueva Zelanda. Los animales, todos machos con un peso de entre 2 y 4 Kg, fueron estabulados en jaulas individuales con libre acceso a comida y agua, y fueron sometidos a ciclos controlados de luz/oscuridad de 12 horas para evitar la influencia de los ciclos circadianos en las medidas de la presión intraocular.

Los conejos empleados en los estudios farmacológicos fueron usados una única vez a la semana con el fin de permitirles recuperarse antes del siguiente ensayo.

En una segunda parte de la presente tesis, se utilizaron dos modelos murinos, una cepa control y la otra cepa de ratones glaucomatosos, siendo todos ellos hembras, para la medida de la presión intraocular, la realización de la técnica cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa y la inmunohistoquímica. El motivo de esta selección se debe a que las hembras de la cepa glaucomatosa desarrollan antes las manifestaciones fenotípicas como la subida de la presión intraocular, y que además se mantiene elevada durante más tiempo (Libby et al., 2005).

Los animales fueron estabulados en jaulas de policarbonato, con comida y agua *ad libitum*, temperatura controlada y fueron sometidos a ciclos controlados de luz/oscuridad de 12 horas para mantener estables los ciclos circadianos en las medidas de la presión intraocular.

Todos los protocolos realizados con ambos tipos de animales cumplieron la normativa europea (86/609/EEC) del Consejo de la Unión Europea sobre uso y manejo de animales de experimentación, la declaración para el uso de animales en investigación oftalmológica y de visión "ARVO Statement for Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research" y pasaron los comités de experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid y de la Comunidad de Madrid, siguiendo las pautas indicadas por el Consejo Internacional de Animales de Laboratorio (ICLAS).

Modelo animal estasis venoso: Conejo albino de Nueva Zelanda.

Los conejos que se utilizaron para los experimentos fueron obtenidos de la Granja Cunicula San Bernardo (Navarra). Los animales se mantuvieron a temperatura y luz controlada, con un fotoperiodo artificial de 12 horas de luz/oscuridad. A todos los animales se les proporcionó comida y agua *ad libitum*. Se emplearon un total de 24 conejos para los estudios de PIO.

Modelo animal avanzado: Ratones controles C57BL/6J y glaucomatosos DBA/2J.

Los experimentos se realizaron en ratones hembra control C57BL/6J y glaucomatosos DBA/2J obtenidos de *Charles Rivers*, el distribuidor europeo de *Jackson Laboratories*. Los animales se mantuvieron a temperatura y luz controlada, con un fotoperiodo artificial de 12 horas de luz/oscuridad. A todos los animales se les proporcionó comida y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron en hembras C57 y DBA, ya que las hembras mutantes desarrollan antes las manifestaciones fenotípicas que los machos, entre ellas, el aumento de PIO (Libby et al., 2005).

En este estudio se emplearon aproximadamente 100 animales mutantes y 100 controles divididos en grupos correspondientes a diferentes estadios 3, 6, 9 y 12 meses que fueron objeto de estudio. Se dividieron en grupos empleándose 50 de ellos para la técnica de qPCR para los 4 estadios de edad, 20 para la técnica de inmunohistoquímica y 30 exclusivos para medidas de PIO.

1.5. PROGRAMAS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	USO
Software LSM 5 Pascal (Zeiss)	Varios
Image J (National Institutes of Health)	Análisis de imágenes
Pubmed (National Institutes of Health)	Motor de búsqueda en bases de datos bibliográficas
GenBank EMBL (National Institutes of Health)	Base de datos para ácidos nucleicos
GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software)	Hoja de cálculo/ Análisis de datos
Step One Plus AB 2.3 (Step One Software)	Análisis PCR
SPPS 22.0 (SPSS Inc.)	Análisis estadístico
Granmo 6.0	Cálculo muestral

Tabla III.5.- Programas y herramientas informáticas

2. MÉTODOS

2.1. MEDIDAS DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR

Las medidas de presión intraocular realizadas sobre los conejos de Nueva Zelanda se realizaron con el tonómetro de rebote TonoVET®, mientras que aquellos hechas sobre los ratones fueron realizadas con el tonómetro de rebote TonoLab® (Ambos instrumentos de Tiolat Oy, Helsinki).

Ambos tonómetros, al no ser tonómetros de contacto, no precisan la aplicación de anestesia tópica. Sin embargo, en el caso de los ratones, es necesaria una sedación para evitar que los animales se muevan y se pueda medir correctamente en el centro de la córnea (Dantias et al., 2003, Wang et al., 2005).

El tonómetro TonoVET® realizaba 5 lecturas, de las cuales se descartaban las 2 más atípicas y se realizaba la media de las 3 lecturas restantes. En el caso del tonómetro TonoLab®, éste debía quedar fijado, de forma que la sonda con la que se toman las medidas quede alineada con el eje óptico del ojo de los ratones, a una distancia de 1-4mm. En cada medida registrada de la PIO se realizaron 6 lecturas, de las cuales se descartaron las 2 más atípicas y se realizó la media de las 4 lecturas restantes. Estos datos son los usados como valor de medida que servirán para los posteriores análisis estadísticos.

Para evitar el efecto putativo del ritmo circadiano, la presión intraocular fue medida siempre a la misma hora del día.

2.1.1. Monitorización de la presión intraocular en ratones

El procedimiento de sedación se realiza a través de una máquina de anestesia inhalatoria en la que el animal es ventilado mecánicamente mediante isoflurano (Figura III.1). Para ello el oxígeno es almacenado en una bala de 3515-3867 gr/cm² controlado por un manómetro ajustado a 1 bar aproximadamente. El punto de encuentro entre el

MATERIAL Y MÉTODOS

oxígeno y el anestésico es el vaporizador regulando la dosis del fármaco a 500 cc/minuto y liberando finalmente el 2,5% de isofluorano en oxígeno al animal.



Figura III.1.- Equipo de anestesia superficial con isofluorano.

Inicialmente, los animales se colocaban en una cámara de metacrilato para la sedación inicial y después de aproximadamente dos minutos, el animal es trasladado a la posición adecuada para realizar la medida de la presión intraocular, manteniendo su sedación a través de un cono nasal que liberaba la misma mezcla de isofluorano y oxígeno (Figura III.2). El cono de la nariz permitía perfectamente el acceso a los ojos.

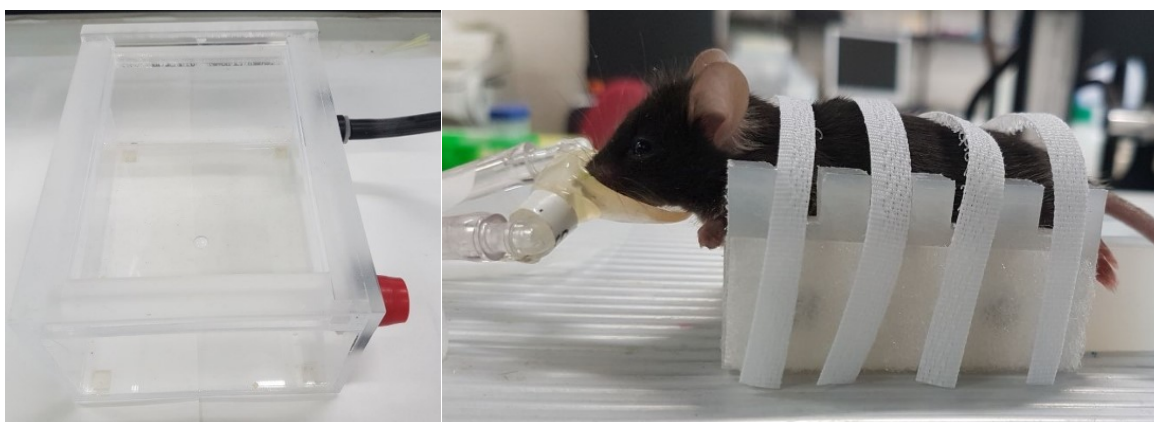


Figura III.2.- Cámara de sedación y cono nasal para liberación de isofluorano

2.1.2. Monitorización de la presión intraocular en conejo de Nueva Zelanda

Para realizar la monitorización de la bajada de presión intraocular de los compuestos ensayados en los conejos de Nueva Zelanda, se procedía a realizar dos medidas basales de la PIO del conejo con 30 minutos de diferencia entre ambas medidas. Después se procedía a instilar en ambos ojos 40 μ l del compuesto seleccionado a 8 conejos y se medía cada 30 minutos hasta llegar a la hora y posteriormente, cada hora hasta las 6 horas desde la instilación del compuesto. Otros 8 conejos eran tratados con 40 μ l de solución salina como controles.

2.1.3. Modelo de hipertensión ocular por estasis venoso. Posición de Trendelenburg.

Con el objetivo de producir un aumento significativo, controlable y repetible de la presión intraocular en los conejos, se les indujo un estasis venoso por gravedad mediante la colocación del animal en la posición de Trendelenburg formando un ángulo de 80° con la horizontal (Meyer, 1885), siguiendo el protocolo descrito por Gual y colaboradores (Gual et al., 1989). La fuerza de la gravedad ejercida durante el tiempo que el animal se encuentra en la posición de Trendelenburg, induce un estasis venoso que eleva la PIO debido principalmente a la compresión del canal de Schlemm y de las venas episclerales (Langham and Taylor, 1960).

Para llevar a cabo el procedimiento, los animales fueron colocados en un cepo, y éste, a su vez, colocado y anclado a un soporte de madera, de manera que la base del cepo formase un ángulo de 80° con la horizontal (Figura III.3).

La PIO fue monitorizada con los animales en la posición prono horizontal, considerándose esos valores como la PIO control basal, y posteriormente volvería a monitorizarse al colocar al animal en la posición de Trendelenburg. Las medidas basales fueron tomadas un mínimo de 6 veces con intervalos de 5 minutos entre ellas, y desde

MATERIAL Y MÉTODOS

que el animal se colocó en la posición de Trendelenburg y se le aplicó el compuesto seleccionado se monitorizó cada 5 minutos durante los primeros 20 minutos. Transcurridos 20 minutos, los animales se colocaban de nuevo en posición horizontal y se dejaba actuar el compuesto hasta el máximo de efecto preestablecido en condiciones normales, momento en el cual, se volvía a colocar al conejo en posición de Trendelenburg y se medía cada 5 minutos durante 20 minutos.



Figura III.3.- Modelo de hipertensión ocular inducido por la posición de Trendelenburg.

La imagen muestra la mediada de la PIO realizada con el tonómetro de no-contacto TonoVet, mientras el animal está colocado en la posición de Trendelenburg (sujeto en el cepo, formando un ángulo de 80° con la horizontal).

2.1.4. Monitorización de la evolución de la presión intraocular en ratones glaucomatosos

Para monitorizar la presión intraocular de los animales, y así poder ver la subida de la misma en los ratones glaucomatosos, se tomaron medidas semanales tanto de los ratones DBA/2J como de los ratones C57BL/6J. En total, se monitorizó la presión intraocular de 40 animales.

Estas medidas se realizaron desde los tres meses hasta los doce meses de edad, siempre a la misma hora del día, como se ha mencionado con anterioridad en metodología de las medidas de la presión intraocular.

2.1.5. Medida de la presión intraocular con tratamiento a largo plazo en ratones

Un grupo de 20 ratones (10 DBA/2J y 10 C57BL/6J) de 5 meses de edad fueron seleccionados para comprobar el posible efecto preventivo que podía tener la aplicación tópica de 5-MCA-NAT sobre estos animales. Otros 20 ratones (10 DBA/2J y 10 C57BL/6J) fueron seleccionados como controles, y se les trataba aplicando solución salina 0.9% también de forma tópica.

Para llevar a cabo la monitorización de la presión intraocular, para poder ver el efecto del 5-MCA-NAT sobre la presión en relación con la edad de los animales, y por tanto del desarrollo de glaucoma en los ratones de la cepa DBA/2J, se tomaron unas medidas basales cada semana que se realizaron entre el quinto y el sexto mes de edad de todos los animales que fueron seleccionados para este estudio. Una vez pasado este tiempo, los animales fueron divididos de forma aleatoria en controles o tratados con 5-MCA-NAT.

Para comprobar la hipótesis del efecto hipotensor del 5-MCA-NAT, se aplica este análogo de melatonina tres veces a la semana, desde los seis hasta los nueve meses de edad, midiendo la presión intraocular una vez a la semana y comparándola con los valores de su grupo control (aquellos tratados con solución salina 0,9%).

2.2. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA EN RATONES

En todos los casos, los animales fueron tratados tópicamente con el mismo volumen, 2 μ L, tanto de la sustancia a estudiar como de la solución salina, en todos los ensayos realizados. Los fármacos fueron aplicados en los dos ojos de los ratones, es decir, de manera bilateral.

Durante la preparación de los compuestos, todos fueron formulados siempre desde solución salina estéril al 0.9%, a excepción de aquellos que no eran solubles en solución salina y que fueron disueltos inicialmente en DMSO, y posteriormente diluidos en salina hasta una concentración de DMSO menor del 0,1%.

Para la realización de los diferentes estudios farmacológicos se emplearon un total de 40 animales. Los animales fueron distribuidos de la siguiente manera: 20 ratones DBA/2J y 20 ratones C57BL/6J. Dentro de cada grupo se distribuyeron al azar 10 animales para tratamiento y 10 animales como control.

2.2.1. Efecto de la instilación tópica de melatonina y 5-MCA-NAT a corto y largo plazo

Con el fin de comprobar el efecto hipotensor de la melatonina y el 5-MCA-NAT, se realizaron diferentes experimentos. En todos los casos se instilaron 2 μ L del compuesto elegido a una concentración fija de 100 μ M, para los estudios del efecto a corto plazo (seis horas de medidas de PIO o Time-Course).

2.2.2. Dosis respuesta

La melatonina y el 5-MCA-NAT fueron instilados en un amplio rango de concentraciones, que iban desde 10 pM hasta 1 mM para poder comprobar el efecto que tenían sobre la presión intraocular, dependiendo de la concentración. La presión

intraocular fue medida tres horas después de instilar el compuesto, debido a que era a este tiempo donde se encontraba el efecto máximo hipotensor del mismo.

2.2.3. Efecto de los receptores melatoninérgicos en la presión intraocular

Para medir el efecto de la PIO en función del tipo de receptor de melatonina activado, se procedió a pretratar 30 minutos antes del agonista a los ratones con los correspondientes antagonistas. Estos antagonistas testados fueron instilados tópicamente a una concentración fija de 100µM.

2.3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante la cuantificación relativa de la expresión de los ARNm de interés mediante análisis de RT-PCR en tiempo real.

2.3.1. Extracción de las muestras de ARN total

Las muestras de ARN total se obtuvieron a partir de tejido de iris y procesos ciliares de las dos cepas de ratón, DBA/2J y C57BL/6J, recogidos en los estadios de 3, 6, 9 y 12 meses de edad, siendo el número total de animales utilizados 86 (43 ratones DBA/2J y 43 ratones C57BL/6J). La manipulación del ARN tuvo lugar en todo momento en condiciones libres de ARNasas. El procedimiento de extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo descrito en un kit comercial (SpeedTools Total RNA Extraction Kit, Biotools), que se basa en la capacidad de unión del ARN a una columna de gel de sílice en presencia de una elevada concentración de sales. Para ello, los tejidos se lisaron en 350 µL de tampón de lisis RL conteniendo 0.1% de β-mercaptoetanol, utilizando un homogenizador-dispersador eléctrico IKA® ULTRA-TURRAX® T-8 Basic para facilitar la ruptura de los tejidos. De esta forma se puede liberar el contenido celular

a la vez que se consigue una rápida inactivación de las ARNasas endógenas, evitando así la degradación del ARN presente en el lisado. A continuación, los lisados tisulares se cargaron en columnas de filtrado para eliminar los restos de membranas celulares y la mayor parte del ovillo de ADN cromosómico. Los lisados ya filtrados se mezclaron al 50% (v/v) con etanol al 70% para conseguir las condiciones óptimas de unión a la columna. Los lisados se cargaron en columnas de purificación y se centrifugaron 30 s a 11.000xg. Para eliminar las sales de la membrana de sílice se realizó un lavado con tampón DBR. Posteriormente, se realizó un tratamiento de 15 min con ADNasa en la propia columna de purificación para eliminar los restos de ADN genómico contaminante. Transcurrido este tiempo se realizaron varios lavados de la membrana de sílice con los tampones de lavado WR1 y WR2 para eliminar cualquier resto de otro tampón y finalmente se procedió a la elución del RNA total purificado en 40 µL de agua libre de ARNasas.

Después de cada extracción de ARN total se realizó un segundo tratamiento de las muestras con ADNasa (30 min, 37°C) utilizando el kit comercial Turbo DNA free (Ambion) para eliminar por completo cualquier resto de ADN genómico contaminante que pudieran interferir en la cuantificación y calidad de las muestras. Finalizado el tiempo de incubación se inactivó la ADNasa siguiendo el protocolo del kit y se recuperó la fracción de ARN total altamente purificada.

2.3.2. Determinación de la concentración y del grado de pureza del ARN total extraído

La concentración del ARN total extraído se determinó cuantificando la absorbancia a 260 nm de las muestras obtenidas en un espectrofotómetro (Eppendorf®). El grado de pureza del ARN se estimó a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra medida a 260nm y a 280nm (A_{260}/A_{280}), que para una disolución de ARN puro debe tener un valor igual o muy próximo a 2.

2.3.3. Retrotranscripción (RT)

La síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total extraído de la muestra correspondiente se realizó utilizando la enzima transcriptasa inversa del virus de leucemia murina M-MLV (400 U), 6 µg de cebadores de secuencia aleatoria y 350 µM de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), siempre en presencia del inhibidor de ARNasas RNase OUT (40 U). La reacción de RT se desarrolló durante 90 minutos a 37°C, seguida de una incubación a 70°C durante 15 minutos con el fin de inactivar la retrotranscriptasa. Además, para cada muestra de ARN total se realizó una reacción de RT en la que no se añadió transcriptasa inversa, para descartar la existencia de ADN genómico contaminante. Todas las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems.

2.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para analizar la expresión de los receptores de melatonina MT₁ y MT₂, así como del receptor GPR50 se llevaron a ensayos de PCR utilizando la ADN polimerasa AmpliTaq Gold® en forma de mezcla de reacción comercial o “Master Mix” (que contiene los dNTPs, el tampón de reacción y la polimerasa), una pareja de oligonucleótidos específicos y 5 µl de ADN molde, en un volumen final de reacción de 25 µL. Los oligonucleótidos para los receptores MT₁, MT₂ y GPR50, así como los del control endógeno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fueron comerciales. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems.

Debido al escaso material biológico de partida y, en consecuencia, a la baja concentración de ARN puro obtenido para cada muestra (inferior a 1 µg en muchos casos), se realizó una primera etapa de preamplificación por PCR de cada ADNc y para cada uno de los genes de interés. Las características de la PCR de preamplificación

fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa AmpliTaq Gold® de 94°C durante 5 minutos, seguido de 14 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones de desnaturalización, anillamiento y elongación: 94°C, 30 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos, respectivamente. Una vez completados los 14 ciclos, se realizó un paso de extensión final durante 7 minutos a 72°C para facilitar la completa elongación de todos los fragmentos amplificados durante la reacción de PCR.

Una vez finalizada la reacción de preamplificación, se procedió a realizar una segunda PCR de los productos de preamplificación obtenidos siguiendo un protocolo prácticamente idéntico al anterior, con la excepción del número de ciclos de amplificación, que en este caso fue de 40. Cada reacción de PCR se realizó en paralelo con un control sin molde para asegurar la ausencia de contaminaciones cruzadas. Una vez finalizadas esta segunda reacción de PCR para cada gen a estudiar, los productos de amplificación resultantes se separaron e identificaron utilizando geles de agarosa al 3%, teñidos con el marcador de ADN SYBR Safe (Molecular Probes). Como marcador de pesos moleculares conocidos se utilizaron los patrones de ADN comerciales Gen ruler de 100 pb y Gene ruler de 1Kb. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Gel Logic 200 Imaging System (Kodak) con exposición a luz ultravioleta.

2.3.5. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR)

Este método permite seguir a tiempo real el proceso de amplificación de los productos obtenidos tras la preamplificación de los ADNc correspondientes, de forma que se puede cuantificar de manera fidedigna los niveles de expresión de un determinado transcrito con relación a la expresión del gen constitutivo GAPDH. El uso de esta técnica para cuantificar la expresión de un determinado gen o genes de interés se basa en la relación directa que existe entre la cantidad de ADN molde inicial y el

producto que se amplifica a partir del mismo. De esta forma a mayor cantidad de ADN molde, más temprana será la aparición de cantidad suficiente del producto amplificado para poder ser detectado por el equipo.

El seguimiento del proceso de amplificación se llevó a cabo mediante el uso de sondas de hibridación TaqMan®. Estas sondas hibridan de forma específica con el amplicón deseado en una región interna del mismo, el cual queda localizado entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo reportero que requiere una luz de excitación de alta energía y en el extremo 3' con una molécula que actúa como apagador o "quencher" absorbiendo la emisión de fluorescencia del extremo 5'. Por tanto, cuando la sonda está intacta, y por lo tanto apagador y reportero están próximos, no emite señal fluorescente. Durante el proceso de extensión de la cadena que se está sintetizando, la Taq polimerasa termoestable, que también posee actividad 5'-exonucleasa, hidroliza la sonda en su extremo 5' de forma que el reportero queda libre lejos del apagador y emite fluorescencia (Figura III.4).

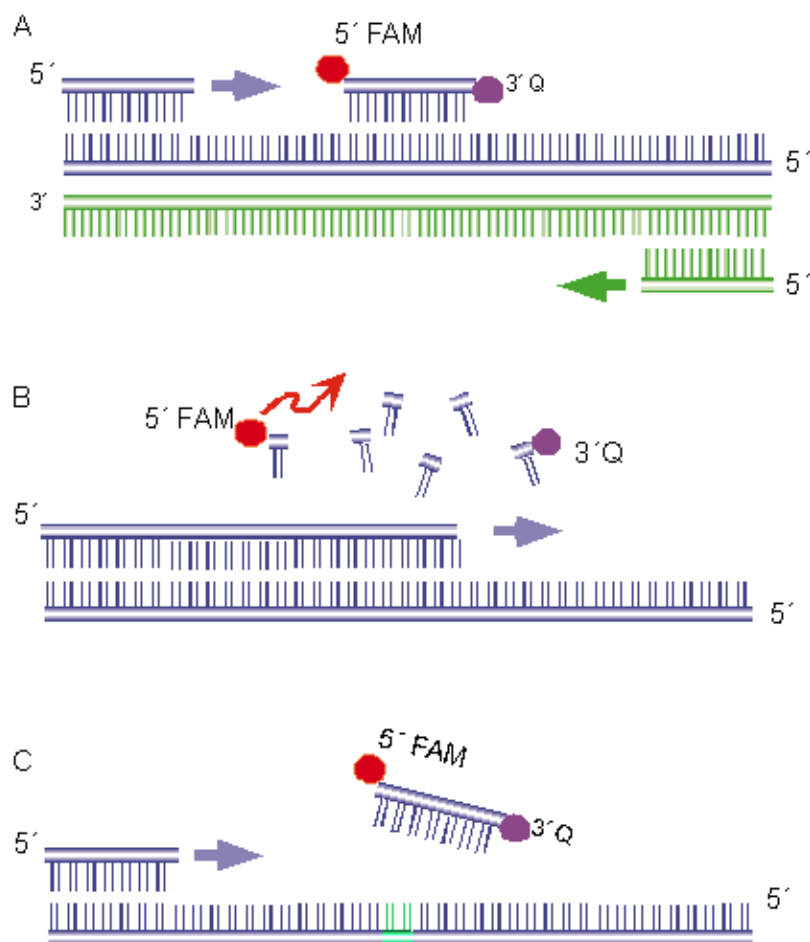


Figura III.4.- Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una Q-PCR.

La sonda hibrida de forma específica con el amplicón deseado en una región interna del mismo, el cual queda localizado entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo reportero FAM y en el extremo 3' con un apagador o “*quencher*” que absorbe la emisión de fluorescencia del extremo 5'. Durante el proceso de extensión de la cadena que se está sintetizando, la ADN polimerasa termoestable con actividad 5'-3' exonucleasa hidroliza la sonda en su extremo 5'. De esta forma el reportero se libera, la fluorescencia que emite no es absorbida por el apagador y su emisión es detectada por el termociclador.

La acumulación de los productos amplificados durante la PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia que se produce como consecuencia de la liberación del fluoróforo reportero. Durante los primeros ciclos de amplificación no se detectan incrementos de fluorescencia ya que es necesario que se acumule una cantidad mínima de producto amplificado para que la fluorescencia detectada por el

sistema sea significativamente distinta a la del valor de fluorescencia basal. A medida que los ciclos de PCR avanzan, aumenta el número de copias de producto generado, por lo que la intensidad de la fluorescencia emitida aumentará también de forma proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado. El termociclador detecta el incremento de fluorescencia (ΔR_n) y lo representa frente al número de ciclos de la PCR. El ciclo de PCR en el que se acumula suficiente producto amplificado como para que el valor de fluorescencia se eleve por encima un determinado valor de fluorescencia se define como ciclo umbral o “cycle threshold” (C_t). El valor del C_t es proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de ADN molde (Figura III.5).

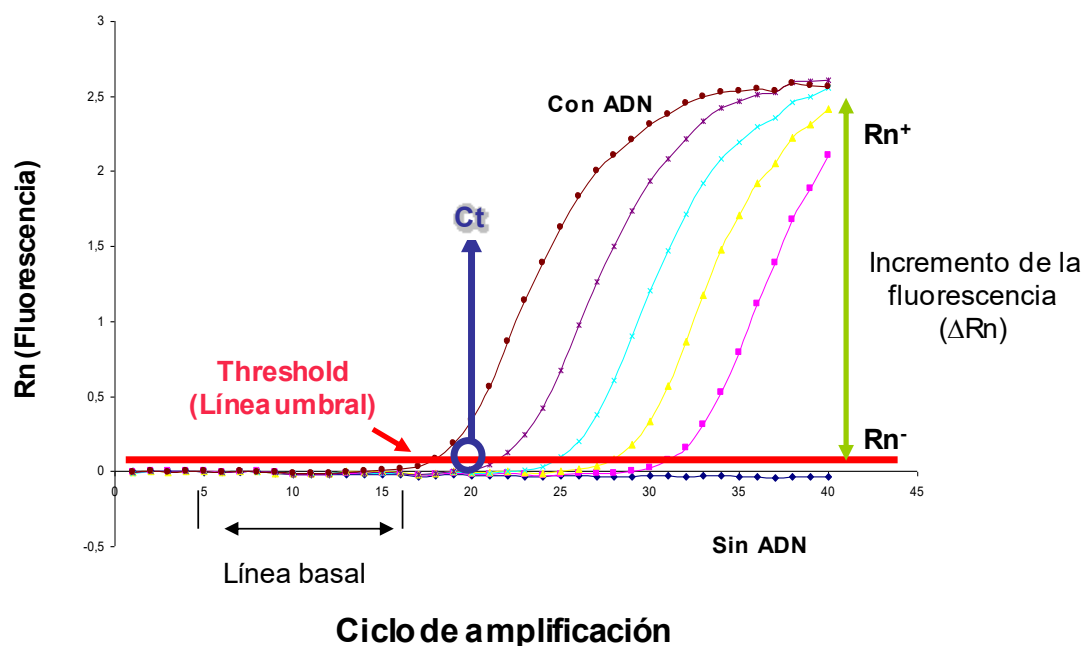


Figura III.5.- Modelo de las curvas obtenidas en una reacción de Q-PCR.

La línea roja indica la línea umbral o *threshold*. En azul se muestra el punto considerado como el valor de C_t . Este valor coincide con el número de ciclos de amplificación en la reacción de PCR necesarios para iniciarse el incremento exponencial de fluorescencia (R_n).

Como ADN molde para ensayos de Q-PCR se utilizaron los productos de preamplificación obtenidos tras la primera PCR diluidos al 20% en agua ultrapura libre

de ARNasas. Para analizar la expresión de los genes de interés se utilizaron cebadores y sondas fluorescentes TaqMan® comerciales marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y con el apagador NFQ-MGB en el extremo 3'. Como control interno de amplificación se analizó la expresión del gen constitutivo GAPDH en todas las muestras obtenidas. Las reacciones de Q-PCR se realizaron usando el sistema StepOne Plus Real Time PCR de Applied Biosystems utilizando el kit de amplificación LuminoCt® Qpcr Ready Mix™ de Sigma.

El ensayo de amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en un volumen final de 25 µl, conteniendo la mezcla comercial de cebadores y sonda correspondiente a cada transcrito, 0,75 ng de ARN de transferencia, la mezcla de amplificación (que contiene los dNTPS, el tampón de reacción y la Taq polimerasa) y 5 µl del producto de preamplificación correspondiente diluido al 20%. La reacción se desarrolló en un programa de 2 pasos: una incubación inicial a 95°C durante 20 segundos para la activación de la polimerasa seguida de 40 ciclos de amplificación: (1 s de desnaturalización a 95°C y 20 s de hibridación a 60°C). La cuantificación de la expresión de cada transcrito se realizó interpolando los valores de Ct de cada muestra en una recta patrón. Para construir cada recta patrón, se hicieron diluciones seriadas a partir de una PCR clásica realizada con los mismos oligonucleótidos utilizados en la Q-PCR y utilizando como molde 5 µl de ADNc. En la curva patrón se representa el logaritmo del número de copias obtenido de cada dilución del gen de interés con el valor de Ct obtenido tras la amplificación. Siempre se trabajó con curvas patrones cuyos coeficientes de correlación eran mayores de 0,98 y que daban una eficiencia de amplificación cercana al 100% para todos los genes. Finalmente, los resultados se expresaron como aumento o disminución de la expresión de cada gen con respecto a la condición referida como control.

2.4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los estudios de expresión y localización de algunas proteínas (MT₁, MT₂ y GPR50) se llevaron a cabo mediante ensayos de inmunohistoquímica.

2.4.1. Obtención de las secciones de los procesos ciliares

Un total de 24 animales (12 DBA/2J y 12 C57BL/6J) se emplearon para la obtención de muestras de procesos ciliares. Los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de Doletal Vetoquinol® y perfundidos pericárdicamente con PBS y con paraformaldehído en PBS 0.1 M.

Tras la perfusión, se enuclearon los ojos y estos fueron fijados mediante inmersión en PFA al 4% durante 1 hora a 4° C. Las manipulaciones microquirúrgicas se efectuaron con la ayuda de un microscopio quirúrgico instalado sobre una columna S-21 (Carl Zeiss, S.A.) y con el instrumental de microcirugía apropiado. Se diseccionaron pasado este tiempo, conservando el polo anterior del ojo ya que es donde se encuentran los procesos ciliares. Se llevó a cabo la crioprotección del polo anterior, sumergiéndolo en una solución de sacarosa al 11% en PBS durante un mínimo de 12 horas para a continuación sumergirlos en una solución de sacarosa al 33% en PBS 1X a 4°C durante toda la noche, el tiempo suficiente para poder preservar el tejido del deterioro ocasionado por la formación de cristales de agua durante el proceso de congelación.

Una vez pasado el tiempo sumergido en sacarosa para completar la crioprotección, se incluyeron en un molde de relleno de medio para la congelación (Tissue-Tek® O.C.T. Compound®), que nos sirvió para los cortes histológicos. Estos bloques con los ojos incluidos en el medio de congelación se guardaron a -80°C hasta que fueron cortados con el criostato.

Antes de proceder a realizar las secciones histológicas correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 hora en el criostato para que alcanzasen la

temperatura óptima de corte. Se realizaron secciones longitudinales de 10 μm de grosor de los ojos en un criostato Leica, se recogieron en portaobjetos y se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

2.4.2. Inmunofluorescencia del tejido

Las crio secciones de los procesos ciliares se atemperaron durante unos 45 minutos, y a continuación se hidrataron con PBS 1X durante otros 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron permeabilizadas (PBS 1X-TritonX10 al 0,25%), para facilitar el acceso de los anticuerpos a todo el tejido, durante media hora. A continuación, fueron incubadas durante una hora con la solución de bloqueo e inmediatamente después incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a -4°C en oscuridad.

Tras la incubación del anticuerpo primario, y los lavados correspondientes, se procedió a la incubación en cámara oscura durante una hora del anticuerpo secundario diluido en PBS Tritón X-100 (0.1%). El anticuerpo secundario utilizado para cada proteína se muestra en la Tabla III.6. Pasado ese tiempo, y después de realizar lavados, se incubaron las muestras durante 10 minutos con yoduro de propidio (IPr) (dilución 1:500), lo cual nos permitió poder ver los núcleos celulares. Finalmente, los portaobjetos con nuestras secciones fueron montados con los cubreobjetos con la ayuda del medio de montaje con propiedades protectoras Vectashield (Vector Laboratories, Palex Medical). Se protegieron de la luz y se guardaron a 4°C .

ANTICUERPOS	DILUCIÓN	PROVEEDOR
Goat polyclonal anti-MT ₁	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit polyclonal anti-MT ₂	1:75	Alomone
Goat polyclonal anti-GPR50	1:75	Santa Cruz Biotechnology
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	1:200	Jackson ImmunoResearch

Tabla III.6.- Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia del tejido

2.4.3. Análisis de las imágenes mediante Image J

Las secciones transversales de los procesos ciliares fueron observadas y fotografiadas a través un microscopio confocal. Este microscopio está equipado con dos filtros: uno que permite poder observar los anticuerpos conjugados con FITC y Alexa Fluor488 (el filtro de fluorescencia BP 505-530) y otro que permite observar la fluorescencia roja de los núcleos de las muestras de tejido (el filtro de rodamina LP 560). El microscopio además tiene integrada una cámara digital de alta resolución, y todo ello estaba monitorizado a través del programa LSM 5 Pascal de Zeiss.

La realización de las fotos y el fotomontaje de las secciones se realizaron utilizando el objetivo de 40x (PlanNeofluar 40x/1.30; Zeiss, Jena, Alemania).

Todas las imágenes tomadas con el microscopio confocal fueron analizadas mediante el programa Image J, un software para el tratamiento de las imágenes.

El software image J nos permite medir el nivel de intensidad del epitelio no pigmentado (ENP) del proceso ciliar. Para valorar la fluorescencia del ENP, se analizaron un total de 6 procesos para cada estadio. En cada imagen, se seleccionaba el proceso a estudiar y se analizaba la fluorescencia en el canal verde siguiendo la forma del proceso, obteniéndose unos valores de intensidad media. Después se procedía a realizar la media entre los 6 valores medios obtenidos y se calculaba el porcentaje de

fluorescencia del estadio normalizando respecto de la fluorescencia del ratón C57BL/6J de 3 meses de edad.

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los datos presentados en esta memoria se representan como la media aritmética y el error estándar de la media (media \pm s.e.m). Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., EE. UU.).

Se utilizaron diferentes técnicas de análisis en función de los grupos a analizar y del tipo de prueba realizada. Cuando las variables estudiadas cumplieron la normalidad (test de normalidad ómnibus de D'Agostino y Pearson) y la comparación se efectuó entre grupos independientes, se realizó el test estadístico de ANOVA de dos vías para muestras independientes con el post-test de Sidak usado para la corrección de la comparación múltiple.

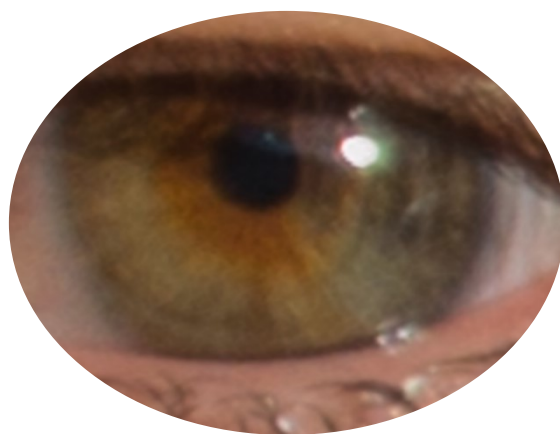
En el caso de los ensayos llevados a cabo para evaluar el efecto de la posición de Trendelenburg sobre la PIO, se utilizó el test estadístico de ANOVA de una vía para muestras pareadas para comparar los de valores PIO basales con los valores de PIO tras colocar al animal en la posición de Trendelenburg. Se realizó a su vez el post-test de Sidak para la corrección de la comparación múltiple.

Por último, para los ensayos realizados en el control del incremento de PIO conforme avanzaba la patología en los ratones, se usó el test de ANOVA de dos vías para muestras pareadas para comparar los de valores PIO al final de la patología con los valores basales de los mismos. Se realizó a su vez el post-test de Sidak para la corrección de la comparación múltiple.

En todos los experimentos con animales se realizó el cálculo del tamaño muestral. Para ello se utilizó el programa estadístico Granmo 6.0, asumiéndose un

riesgo alfa de 0.05, una potencia estadística del 80% y una relación entre grupos 1:1, obteniéndose un resultado de al menos 8 animales por grupo.

Los niveles de significación establecidos han sido: $p < 0.001$, diferencia extremadamente significativa (**); $p < 0.01$, diferencia muy significativa (**); $p < 0.05$, diferencia significativa (*). Los niveles superiores a 0.05 se han tomado como no significativos (ns).



RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES

Nuestros estudios se iniciaron en base a la experiencia previa de nuestro grupo de investigación, la cual había demostrado el efecto de bajada de PIO sobre conejos normotensos con la melatonina y análogos como la 6-Cl-melatonina, 2-I-melatonina, 2-Phe-melatonina, y 5-MCA-NAT, además del precursor N-acetil-triptamina (Pintor et al., 2003).

Con intención de realizar nuevas pruebas en una condición similar al glaucoma, se encontró un método eficaz y económico de inducir una elevación en la PIO de manera transitoria. Para ello, se utilizó la denominada posición de Trendelenburg que, como se ha explicado anteriormente, consiste en colocar al animal en un ángulo de 80° con la cabeza hacia abajo, lo que provoca un estasis venoso, y por lo tanto una subida rápida de la PIO (Meyer, 1885).

Debido a la transitoriedad del anterior método, se buscó también un animal más próximo filogenéticamente al humano, que desarrollara la patología espontáneamente, o que al menos pudiera ser inducido a través de cualquier método, pero con efecto permanente.

El ratón DBA/ 2J es usado como uno de los modelos de glaucoma más comunes y ha proporcionado números hallazgos sobre la enfermedad. Es un modelo de glaucoma pigmentario espontáneo que conduce a una obstrucción del ángulo y una elevación de la PIO asincrónica debido a dos mutaciones que causan una atrofia estromal del iris (gen *Tryp 1*) y una dispersión pigmentaria (gen *Gpnmb*) (Anderson et al., 2002). Esto, unido a las demás propiedades mencionadas en la introducción, hacen de este animal un modelo de experimentación valioso.

Con estos dos modelos de experimentación animal, se pretende corroborar la eficacia de los compuestos de melatonina para el tratamiento del glaucoma, así como caracterizar los receptores de melatonina presentes en cuerpo ciliar e iris de los ratones DBA/2J y sus controles naturales, los ratones C57BL/6J.

1.1. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN CONEJOS NORMOTENSOS.

Con el objetivo de corroborar el efecto de los análogos de melatonina sobre la PIO de conejos normotensos y probar un nuevo compuesto, la agomelatina, se realizaron nuevos experimentos.

Dichos experimentos se realizaron con el tonómetro TonoVet. El efecto fue evaluado mediante ensayos de curso temporal (time-course) de la PIO, llevados a cabo en grupos de ocho conejos albinos normotensos de la raza Nueva Zelanda durante 6 horas consecutivas. Debido a que la PIO basal puede fluctuar entre los distintos animales de forma natural, todos los datos fueron normalizados con respecto a los dos valores de PIO basales de los animales controles (Rango entre 8.15 y 9.42 mm Hg).

Como se puede observar en la figura IV.1, la melatonina y sus análogos, disminuyeron de manera gradual la PIO, alcanzando el máximo a las 3 horas tras su instilación. El análogo de melatonina, 5-MCA-NAT fue el que consiguió una mayor reducción de la PIO, con un valor final de 48.7 ± 2.4 % respecto a los valores controles ($p < 0.001$), seguido de la agomelatina cuyo valor fue de 79.2 ± 1.4 % ($p < 0.001$) y de la melatonina con un valor de 81.4 ± 1.8 % ($p < 0.001$).

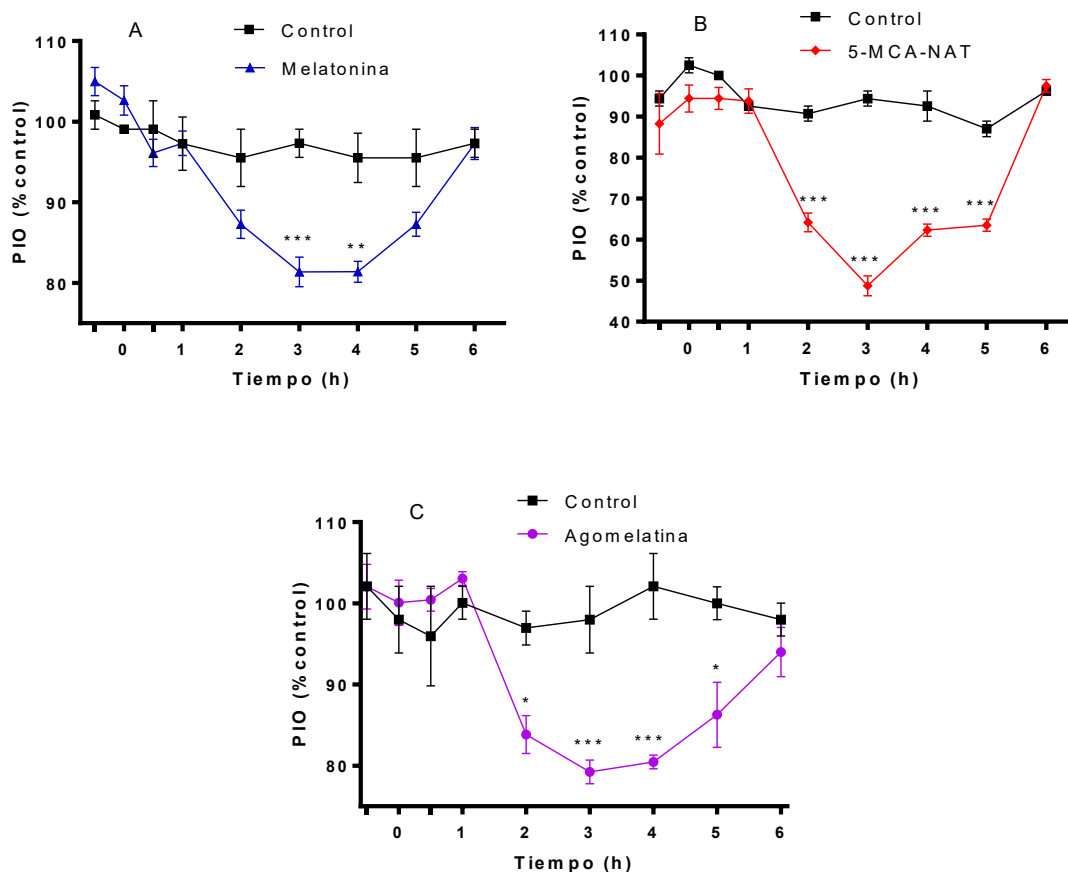


Figura IV.1.- Efecto de la melatonina y sus análogos sobre la PIO a lo largo del tiempo en conejos albinos de la raza Nueva Zelanda.

La gráfica representa la respuesta de la PIO de los animales, medida durante 6 horas, al ser instilados tópicamente todos con una dosis fija (40 μ l 100 μ M) en ambos ojos de **A)** melatonina, **B)** 5-MCA-NAT y **C)** agomelatina. Los valores de PIO (media \pm s.e.m.) están normalizados respecto a los valores basales de los animales control. Los resultados corresponden a la media de 8 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al tratamiento control.

Dado que el nuevo análogo de melatonina, la agomelatina, tuvo un efecto hipotensor en la PIO a una concentración fija (100 μ M), se quiso valorar si su efecto era dependiente de la concentración. Para ello, se estudió el efecto de la agomelatina sobre la PIO en un rango de concentraciones entre 1 pM y 0.1 mM, midiendo la PIO a las dos horas.

RESULTADOS

Como se puede observar en la figura IV.2, que muestra la curva concentración-respuesta de agomelatina, se produce un descenso de la PIO dependiente de la concentración. El valor calculado de pD_2 fue de 9.8 ± 0.5 ($EC_{50} = 0.17$ nM).

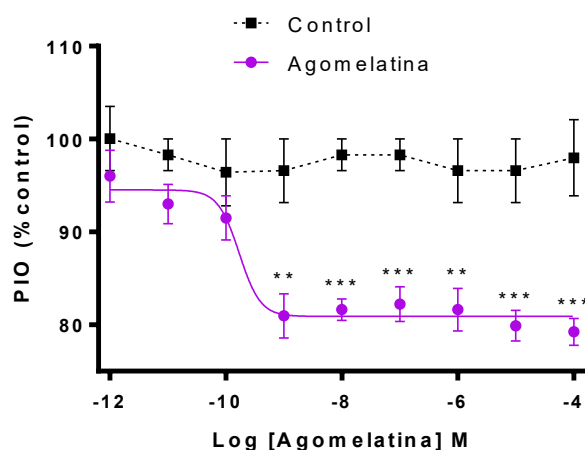


Figura IV.2.- Curva dosis-respuesta de agomelatina sobre la presión intraocular.

La agomelatina fue testada en un rango de concentraciones de entre 1 pM y 0.1 mM. Los datos se representan como el porcentaje de bajada de la PIO respecto a los valores basales. Los valores representan la media \pm s.e.m. de 8 experimentos independientes. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al tratamiento control.

Teniendo en cuenta el perfil farmacológico observado en los ensayos con agomelatina y que ha sido propuesto como un potente agonista de los receptores de melatonina MT_1 y MT_2 , se realizaron una serie de ensayos con antagonistas melatoninérgicos con el fin de discriminar qué receptores estaban implicados en el descenso de la PIO. Para ello se testaron los antagonistas luzindol (antagonista de melatonina no selectivo), 4PPDOT (antagonista MT_2) y prazosin (antagonista MT_3). Debido al efecto del prazosin sobre el receptor α_1 , se aplicó corinantina para probar el efecto de inhibición sólo en este receptor.

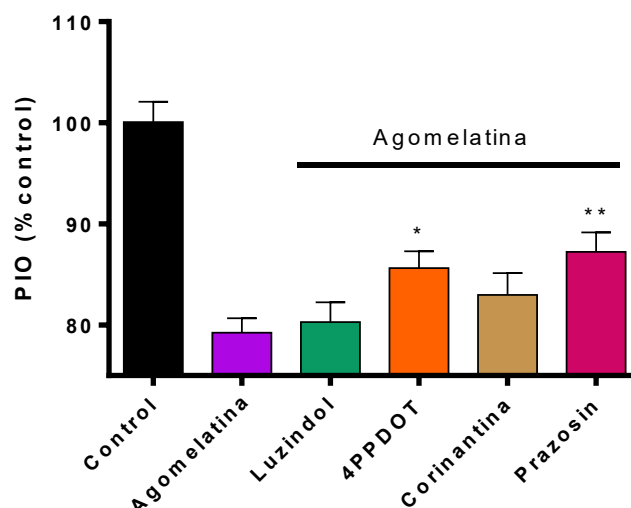


Figura IV.3.- Efecto de los antagonistas melatoninérgicos en la respuesta de agomelatina sobre la presión intraocular.

La gráfica representa el efecto producido por los antagonistas melatoninérgicos (Luzindol, 4PPDOT y prazosin) y el antagonista selectivo de α_1 (Corinantina) (Todos testados a una concentración fija de 100 μ M, 10 μ l) a la respuesta inducida por la agomelatina sobre la PIO. Los valores de presión intraocular (media \pm s.e.m.) están normalizados respecto a los valores controles (animales instilados sólo con vehículo, solución salina). Todos los resultados corresponden a la media de 8 experimentos independientes. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al tratamiento sólo con el agonista.

Como se puede observar en la figura IV.3, el antagonista de melatonina no selectivo, luzindol, así como el antagonista selectivo α_1 , corinantina, no son capaces de revertir el efecto hipotensor de la agomelatina. Por el contrario, 4PPDOT y prazosin revierten parcialmente el efecto de bajada de PIO. Comparado con agomelatina sólo (79.2 ± 1.4 %), este compuesto redujo la PIO en presencia de 4PPDOT a un 85.6 ± 1.6 % y con prazosin a un 87.2 ± 1.9 %, respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el compuesto agomelatina sobre la PIO, se realizó una comparación del compuesto frente a otros agentes hipotensores presentes en el mercado. Para ello, se usaron los compuestos Xalatan®

RESULTADOS

0.005% (Latanoprost), Trusopt® 2% (Dorzolamida), Timofтол® 0.5% (Timolol) y Alphagan® 2 mg/ml (Brimonidina), con un volumen fijo de 40 µl.

Como puede observarse en la figura IV.4, los compuestos comerciales Xalatan y Timofтол, producen una bajada de PIO similar a agomelatina ($76.6 \pm 2.3 \%$ y $75.9 \pm 3.1 \%$, respectivamente). Sin embargo, los compuestos Trusopt y Alphagan, si son capaces de reducir la PIO de manera más significativa que agomelatina ($61.3 \pm 2.8 \%$ y $59.4 \pm 3.5 \%$, respectivamente).

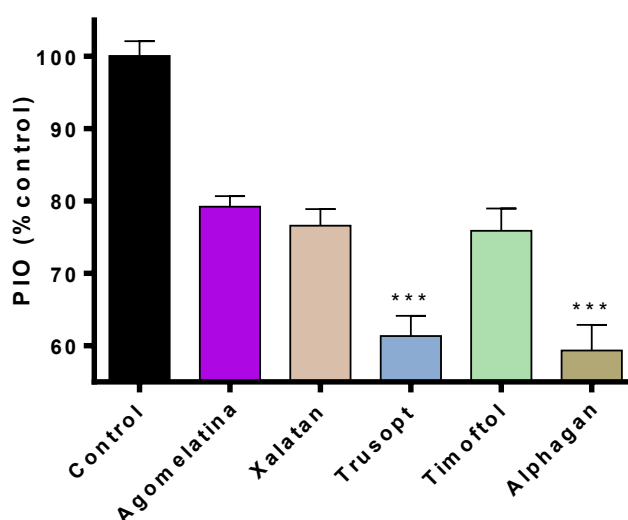


Figura IV.4.- Efecto de algunos compuestos antiglaucomatosos comerciales en comparación con agomelatina sobre la presión intraocular.

La gráfica representa el efecto producido por algunos compuestos antiglaucomatosos (Xalatan®, Trusopt®, Timofтол® y Alphagan®, 40µl) en comparación con la agomelatina sobre la PIO. Los valores de presión intraocular (media \pm s.e.m.) están normalizados respecto a los valores controles (animales instilados sólo con vehículo, solución salina). Todos los resultados corresponden a la media de 8 experimentos independientes. *** $p < 0.001$ respecto al tratamiento con agomelatina.

1.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE TRENDELENBURG COMO MODELO TRANSITORIO DE HIPERTENSIÓN.

El siguiente objetivo fue evaluar si la melatonina y sus análogos disminuían más la PIO en un modelo de hipertensión. Para ello se empleó la técnica de Trendelenburg que, como se ha explicado anteriormente, consiste en colocar al conejo en un ángulo de 80° con la cabeza hacia abajo, lo que provoca un éstasis venoso, y por lo tanto una subida rápida de la PIO.

Primero se comprobó que el método era adecuado para obtener un modelo transitorio de hipertensión, obteniendo unos valores de incremento de la PIO en torno al 70% (172.5 ± 9.7 , $n=8$). Dicho incremento se produce entre 3-5 minutos después de colocar al animal en dicha posición, como puede observarse en la figura IV.5.

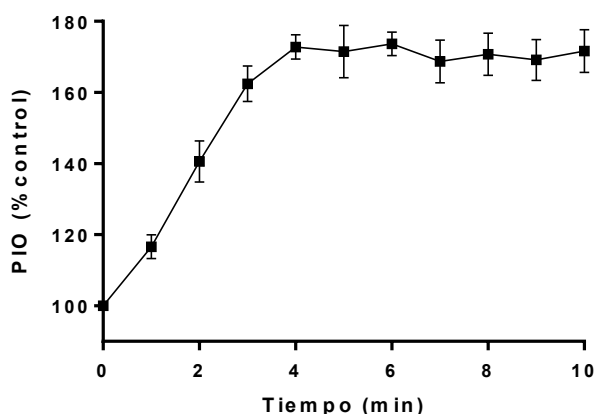


Figura IV.5.- Variación de la presión intraocular con el tiempo en posición de Trendelenburg.

La gráfica representa el efecto producido por la posición de Trendelenburg sobre la PIO. Los valores de presión intraocular (media \pm s.e.m.) están normalizados respecto a los valores iniciales (animal en posición horizontal). Los resultados corresponden a la media de 8 conejos independientes.

RESULTADOS

Seguidamente, se procedió a testar los mismos compuestos comerciales anteriormente usados (Xalatan®, Trusopt®, Timoftol® y Alphagan®, 40µl) para comprobar si se producía un aumento del poder hipotensor de los mismos.

Se detallan en la tabla IV.1, los valores obtenidos en posición prona y en posición de Trendelenburg para los compuestos comerciales. Puede observarse como para todos los compuestos menos para Alphagan®, se produce una bajada de PIO dos veces mayor que en posición prona.

Δ PIO	Posición Prona	Posición Trendelenburg
	MEDIA ± SEM	MEDIA ± SEM
Control	0.0 ± 4.8 %	0.0 ± 5.0 %
Xalatan®	30.1 ± 4.2 %	74.2 ± 6.6 %
Trusopt®	35.0 ± 4.3 %	74.1 ± 8.8 %
Timoftol®	28.9 ± 4.6 %	69.9 ± 6.6 %
Alphagan®	41.3 ± 3.8 %	42.2 ± 8.6 %

Tabla IV.1. Variación de la PIO en posición prona y Trendelenburg con varios compuestos comerciales.

Los valores de PIO (media ± s.e.m.) están normalizados respecto a los valores basales de los animales control y representados como el porcentaje de variación de la PIO respecto a los mismos. Los resultados corresponden a la media de 8 experimentos independientes.

1.3. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN CONEJOS EN CONDICIONES HIPERTENSAS.

Una vez comprobado que el método para simular una condición de hipertensión transitoria funcionaba correctamente, se procedió a comprobar cuál era la bajada de PIO de la melatonina y sus análogos en dicha condición. Tal y como se muestra en la figura IV.6, la bajada de PIO aumentó en los tres compuestos en condiciones de hipertensión. El compuesto que disminuyó más la PIO fue el 5-MCA-NAT con una reducción de un 70.8 ± 9.9 % frente al 51.7 ± 3.7 % en posición horizontal. El siguiente

compuesto fue la agomelatina con una bajada del 47.5 ± 12.8 % frente al 23.5 ± 3.2 %. Por último, está la melatonina que ofrece valores similares en ambas posiciones (22.5 ± 9.9 % frente al 19.0 ± 2.2 %).

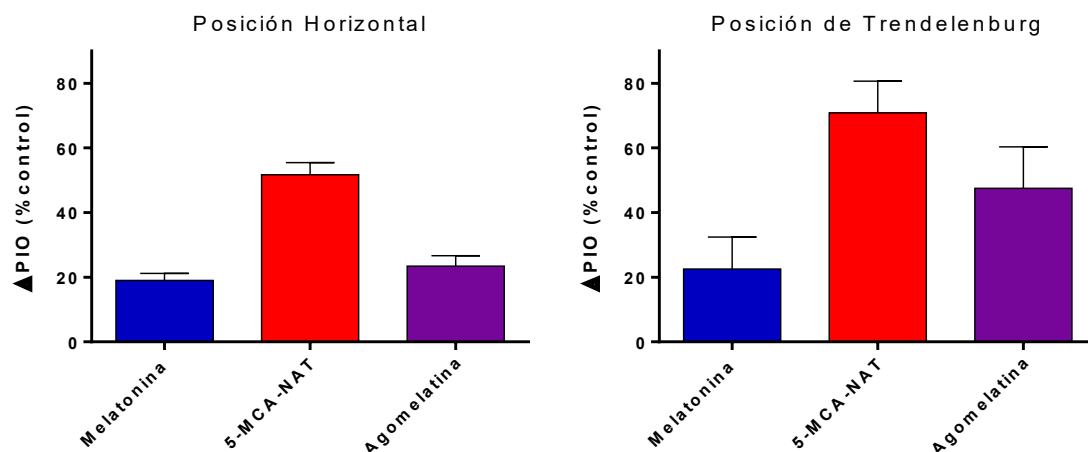


Figura IV.6 Efecto máximo de los análogos de melatonina en posición horizontal y en posición de Trendelenburg.

La gráfica representa los valores de reducción máximos de PIO de los animales, al ser instilados tópicamente en ambos ojos con una dosis fija ($40 \mu\text{l}$ $100 \mu\text{M}$) de melatonina, 5-MCA-NAT y agomelatina. Los valores de PIO (media \pm s.e.m.) están normalizados respecto a los valores basales de los animales control y representados como el porcentaje de variación de la PIO respecto a los mismos. Los resultados corresponden a la media de 8 experimentos independientes.

1.4. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN RATONES C57BL/6J Y DBA/2J.

El siguiente objetivo de la tesis fue testar los compuestos melatoninérgicos en un modelo animal de glaucoma. Se seleccionó el ratón DBA/2J como modelo animal de glaucoma y se realizó un seguimiento a lo largo del tiempo para comprobar la evolución de la patología en el animal, así como en el ratón control, el C57BL/6J.

RESULTADOS

La figura IV.7 muestra la evolución temporal de la PIO de ambos ratones durante 1 año. En ella se puede apreciar como el ratón DBA/2J mantiene su PIO estable hasta los 6 meses de edad y después experimenta un incremento hasta alcanzar un $155.4 \pm 7.3 \%$ a los 12 meses de edad.

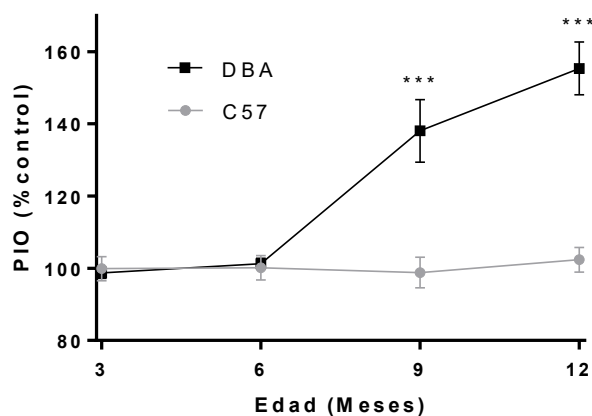


Figura IV.7 Evolución temporal de la PIO en ratones C57BL/6J y DBA/2J.

La gráfica representa la respuesta de la PIO de los animales, medida durante 12 meses, al ser instilados tópicamente con una dosis fija de solución salina ($2 \mu\text{l}$ $100 \mu\text{M}$) en ambos ojos. La diferencia entre ambas cepas se detecta a los 9 meses de edad ($***p<0.001$).

Una vez comprobada la subida de PIO de los animales DBA/2J, se procedió a evaluar el efecto de la melatonina y sus análogos sobre la PIO de los ratones C57BL/6J y DBA/2J. El análisis se hizo entre los 10 y 12 meses de edad, para observar el comportamiento en animales glaucomatosos.

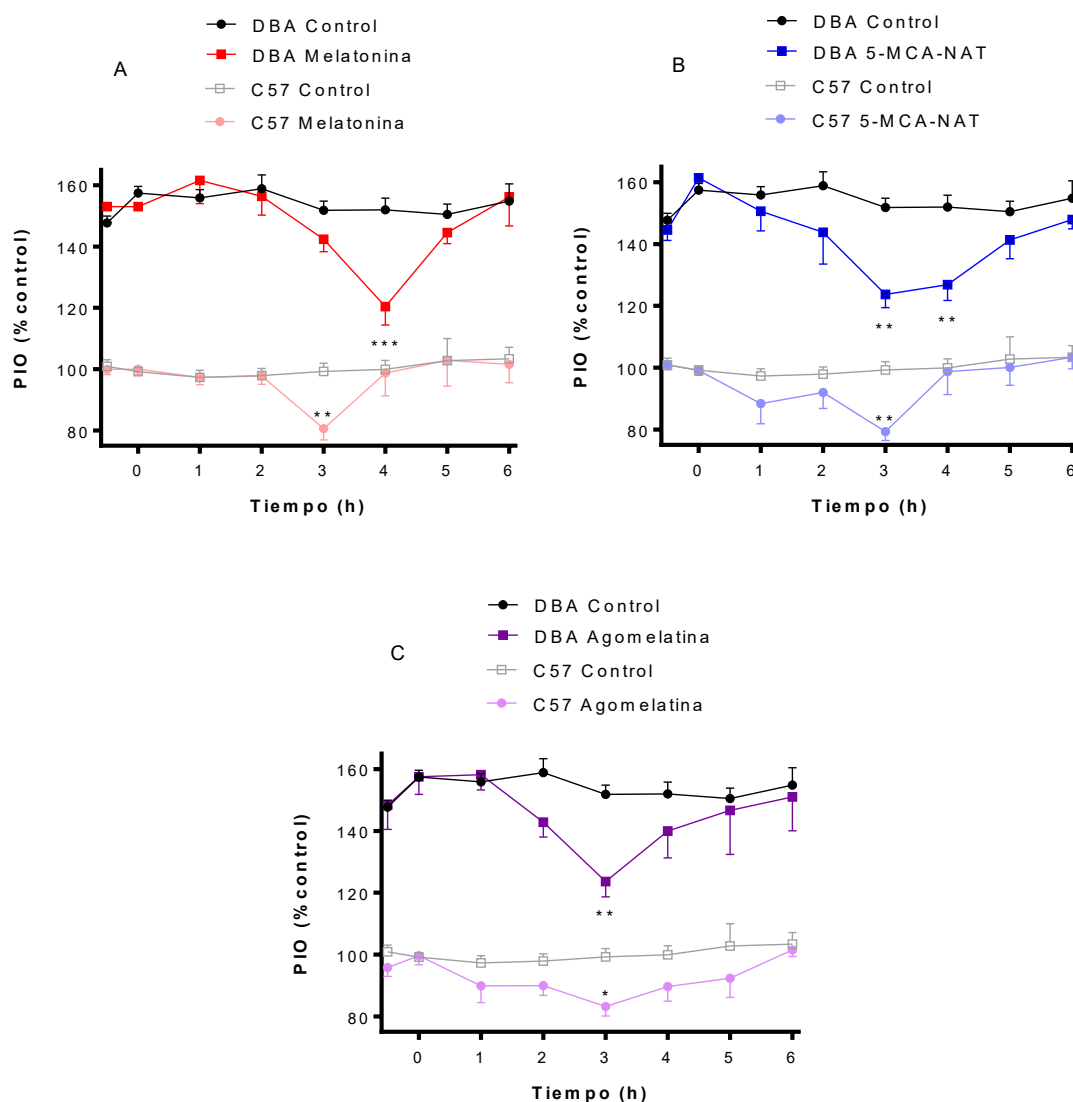


Figura IV.8 Efecto de la melatonina y sus análogos sobre la PIO a lo largo del tiempo en ratones C57BL/6J y DBA/2J.

La gráfica representa la respuesta de la PIO de los animales, medida durante 6 horas, al ser instilados tópicamente todos con una dosis fija (2 μ l 100 μ M) en ambos ojos de **A)** melatonina, **B)** 5-MCA-NAT y **C)** agomelatina. Los valores de PIO (media \pm s.e.m.) están normalizados respecto a los valores basales de los animales control. Los resultados corresponden a la media de 8 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al tratamiento control.

En la figura IV.8, se puede observar que la melatonina y sus análogos, disminuyeron la PIO de manera gradual, alcanzando el máximo entre las 3 y 4 horas tras su instilación dependiendo de la cepa animal y el compuesto usado. La melatonina

RESULTADOS

redujo la PIO en un $19.4 \pm 3.7 \%$ y en un $32.6 \pm 6.0 \%$ en el ratón C57BL/6J y DBA/2J respectivamente, con el máximo de efecto a las 4 horas en el DBA/2J y a las 3 horas en el ratón C57BL/6J, como puede verse en la figura IV.8A.

De manera análoga, en la figura IV.8B puede verse que el 5-MCA-NAT es capaz de reducir la PIO en un $20.7 \pm 2.8 \%$ y $29.3 \pm 4.3 \%$ en el C57BL/6J y DBA/2J respectivamente, con el máximo de efecto a las 3 horas en ambos ratones.

En el caso de la agomelatina, la reducción de PIO fue del $16.8 \pm 3.0 \%$ y del $29.4 \pm 4.9 \%$ en el C57BL/6J y DBA/2J respectivamente, con el máximo de efecto también a las 3 horas en ambos ratones (Figura IV.8C).

Dado los resultados obtenidos con melatonina y sus análogos, que demuestran una mayor bajada de PIO en ratones hipertensos, se procedió a realizar una caracterización farmacológica completa de la melatonina y su análogo, el 5-MCA-NAT.

Se decide descartar la agomelatina del estudio dado su efecto moderado en la PIO y debido a no contar con un número suficiente de ratones para desarrollar una caracterización completa.

Se quiso valorar si el efecto de bajada de PIO para la melatonina y el 5-MCA-NAT era dependiente de la concentración en estas cepas de ratón. Para ello, se estudió el efecto de la melatonina y del 5-MCA-NAT sobre la PIO en un rango de concentraciones entre 10 nM y 0.3 mM, y entre 10 nM y 1 mM respectivamente.

Como se puede observar en la figura IV.9A, que muestra la curva concentración-respuesta de melatonina, se produce un descenso de la PIO dependiente de la concentración para ambas cepas. El valor calculado de pD_2 fue de 4.3 ± 0.3 y 4.5 ± 0.1 para C57BL/6J y DBA/2J respectivamente, lo que equivale a un EC_{50} de 50 μ M y 34 μ M.

De la misma forma se puede comprobar que el 5-MCA-NAT también muestra una curva concentración-respuesta con un descenso de la PIO dependiente de la concentración para ambas cepas (Figura IV.9B). El valor calculado de pD_2 fue de $5.0 \pm$

0.4 y 5.2 ± 0.2 para C57BL/6J y DBA/2J respectivamente, lo que equivale a un EC_{50} de 11 μ M y 7 μ M.

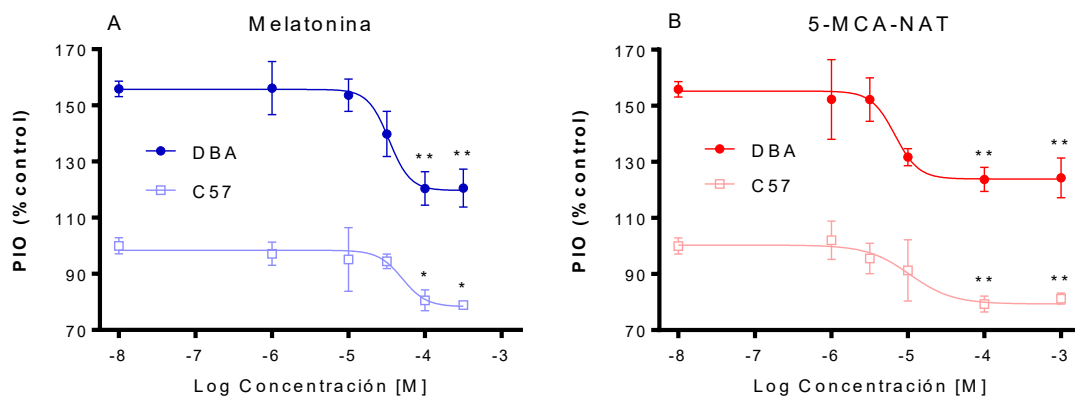


Figura IV.9.- Curva dosis-respuesta de melatonina y 5-MCA-NAT sobre la presión intraocular.

Los compuestos fueron testados en diferentes rangos de concentraciones, estando la melatonina entre 10 nM y 0.3 mM (**A**) y el 5-MCA-NAT entre 10 nM y 1 mM (**B**). Los datos se representan como el porcentaje de bajada de la PIO respecto a los valores basales de cada cepa. Los valores representan la media \pm s.e.m. de 8 experimentos independientes. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al tratamiento control.

Con la intención de ver si existen diferencias en el antagonismo de los receptores de melatonina en los dos tipos de animales, se probaron diferentes antagonistas a una concentración fija de 100 μ M, como se indicó en métodos.

En el caso de la melatonina, tanto luzindol como 4PPDOT fueron capaces de revertir el efecto hipotensor en los ratones DBA/2J, mientras que prazosin no pudo. En el ratón C57BL/6J, todos los antagonistas pudieron revertir el efecto (Figura IV.10A).

En cuanto al 5-MCA-NAT y tal y como se muestra en la figura IV.10B, el único antagonista que pudo revertir el efecto en los ratones DBA/2J fue el 4PPDOT. En el ratón C57BL/6J, todos los antagonistas pudieron bloquear el efecto del 5-MCA-NAT.

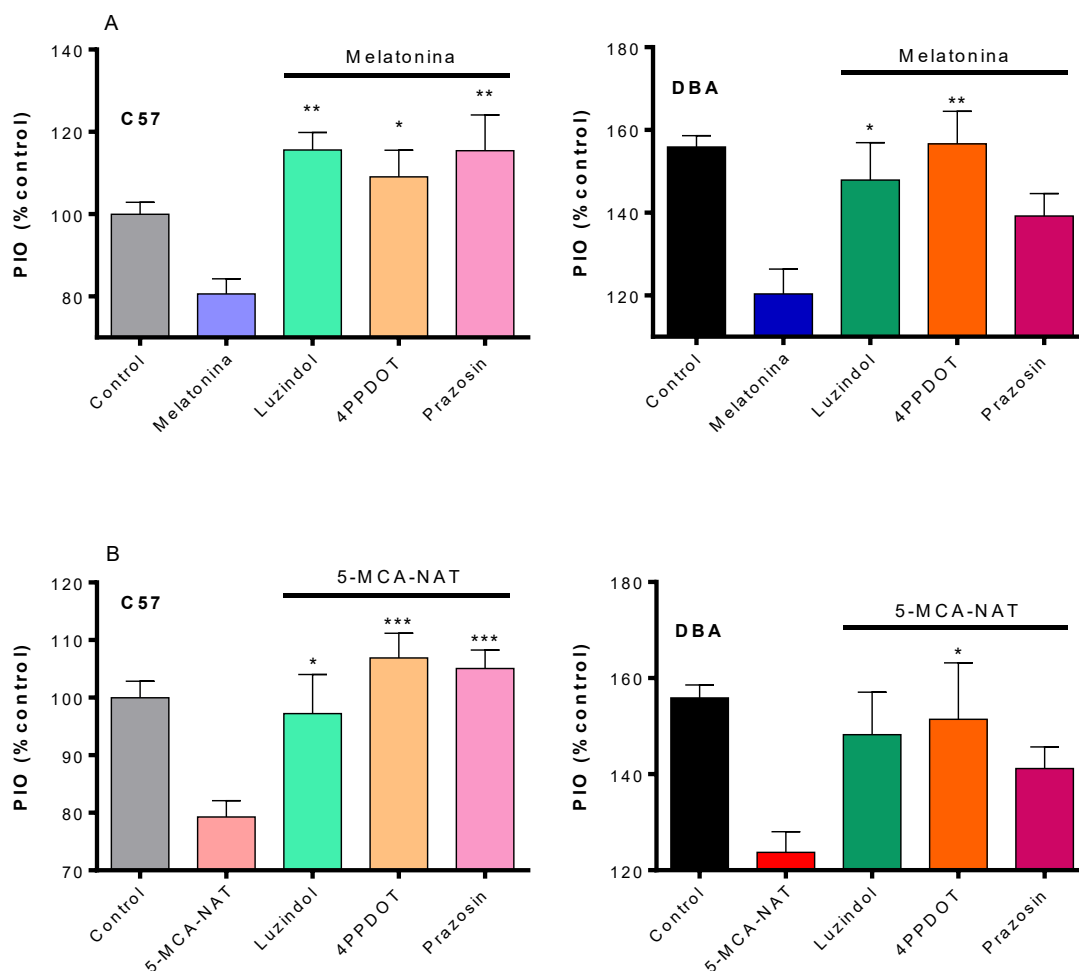


Figura IV.10.- Efecto de los antagonistas melatoninérgicos en la respuesta de melatonina y 5-MCA-NAT sobre la presión intraocular.

La gráfica representa el efecto producido por los antagonistas melatoninérgicos (Luzindol, 4PPDOT y prazosin, todos testados a una concentración fija de 100 μ M, 2 μ l) a la respuesta inducida por la melatonina (**A**) en C57 y DBA (gráfica izquierda y derecha) y por 5-MCA-NAT (**B**) sobre la PIO. Los valores de presión intraocular (media \pm s.e.m.) están normalizados respecto a los valores controles (animales instilados sólo con vehículo, solución salina). Todos los resultados corresponden a la media de 8 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al tratamiento sólo con el agonista.

1.5. EFECTO DEL 5-MCA-NAT COMO TRATAMIENTO A LARGO PLAZO SOBRE LOS RATONES C57BL/6J Y DBA/2J.

Teniendo en cuenta el efecto hipotensor encontrado en el compuesto 5-MCA-NAT sobre los ratones C57BL/6J Y DBA/2J, se planteó una rutina de tratamiento continuado para evaluar el posible efecto terapéutico del mismo. Para ello, y tal como se recoge en métodos, se realizaron tres aplicaciones semanales de forma bilateral (2 μ l, 100 μ M) desde los 6 a los 9 meses de edad de los ratones.

Tal y como puede verse en la figura IV.11, se produce un aumento de la PIO en los ratones DBA a partir de los 6 meses de edad. En los ratones glaucomatosos DBA/2J se produce un cambio de tendencia en el incremento de PIO a partir de las 5 semanas de tratamiento, que es estadísticamente significativo a partir de la semana 11 de tratamiento ($135 \pm 3\%$ frente a $121 \pm 3\%$). Por el contrario, en los ratones C57BL/6J tratados con 5-MCA-NAT no existe ninguna variación respecto de los controles.

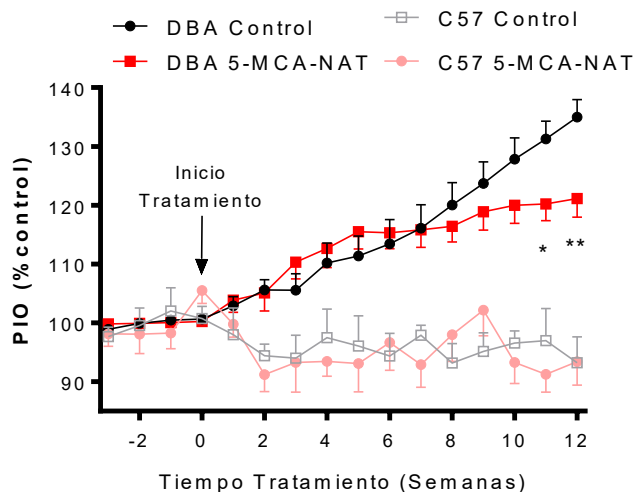


Figura IV.11.- Efecto del tratamiento continuado con 5-MCA-NAT sobre la presión intraocular en ratones C57BL/6J y DBA/2J.

La gráfica representa el efecto producido por el tratamiento continuado de 5-MCA-NAT aplicado 3 veces por semana durante 12 semanas a una concentración fija de 100 μ M, 2 μ l. Los valores de presión intraocular (media \pm s.e.m.) están normalizados respecto los valores medios encontrados entre los 5 y 6 meses de edad de cada cepa. Todos los resultados corresponden a la media de 20 animales independientes para cada condición. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al tratamiento con solución salina.

2. EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS TRANSCRITOS DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LOS PROCESOS CILIARES DE RATONES C57BL/6J Y DBA/2J.

El siguiente objetivo de la tesis fue comprobar los cambios que se producen con la evolución de la patología en los receptores de melatonina.

Para ello se procedió a evaluar la presencia de los receptores de melatonina MT₁, MT₂ y GPR50 en los procesos ciliares de ratones control *versus* glaucomatosos.

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de PCR a tiempo final con una muestra de ADNc obtenido a partir de la retrotranscripción del ARN total extraído de los procesos ciliares de ratones adultos C57BL/6J. Como puede observarse en la figura IV.12, se detectaron las 3 bandas específicas correspondientes a los productos de amplificación de los transcritos de los receptores propuestos (GPR50, MT₁ y MT₂), demostrando así que dichos receptores se expresaban en los procesos ciliares de los ratones control.

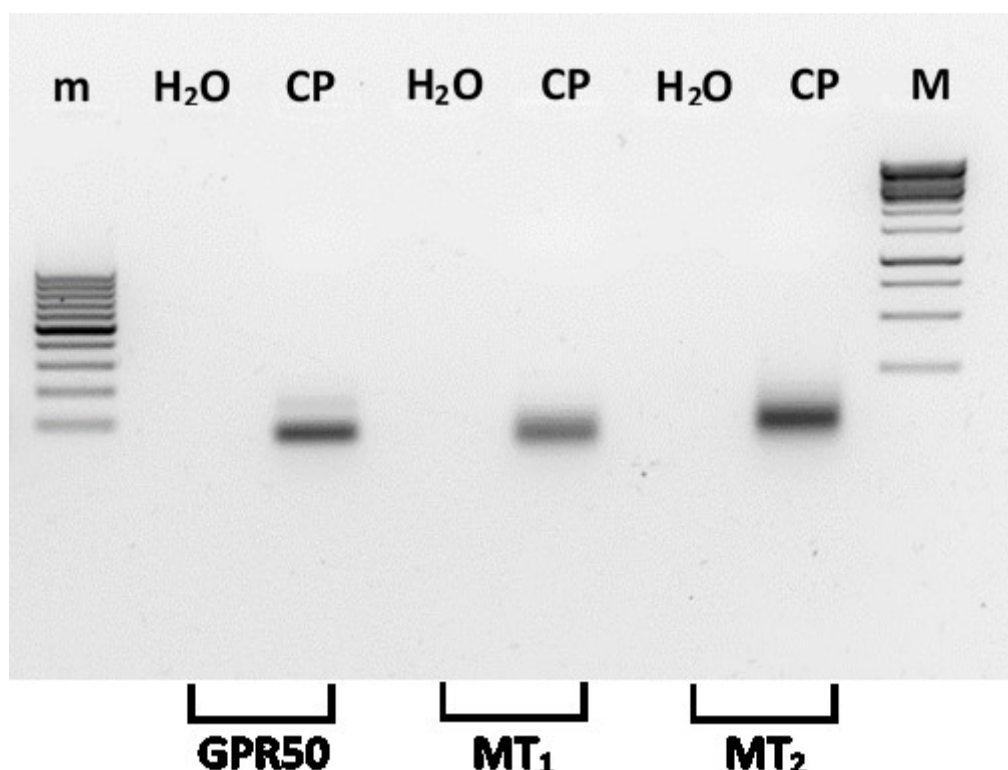


Figura IV.12. Expresión de receptores de melatonina en los procesos ciliares de ratones C57BL/6J.

La figura muestra los resultados de la prueba de PCR a tiempo final para los receptores GPR50, MT₁ y MT₂. Los pesos moleculares de las bandas se situaron próximos a los 100 pares de bases (pb) y fueron amplificados a partir del ADNc obtenido a partir de la retrotranscripción del ARN total extraído de los procesos ciliares de ratón adulto C57BL/6J. No se detectaron productos de amplificación en los ensayos paralelos realizados sin ADN molde (H₂O). M: patrón ADN 1 Kb (10000 - 250 pb); m: patrón ADN 100 bp (1000 - 100 pb).

A continuación, se realizaron experimentos análogos en ratones glaucomatosos DBA/2J, demostrando que los transcritos correspondientes a los receptores MT₁, MT₂ y GPR50 también se expresaban en los procesos ciliares de dichos animales. Para comprobar si los niveles de expresión de los receptores de melatonina variaban entre los animales controles y los glaucomatosos, analizamos la expresión temporal de los receptores MT₁, MT₂ y GPR50 en los procesos ciliares de ratones C57BL/6J y DBA/2J en diferentes edades, tanto por PCR cuantitativa como por técnicas de inmunohistoquímica.

2.1. EL RECEPTOR MT₁

Los resultados obtenidos en los estudios de PCR cuantitativa mostraron que la expresión de MT₁ en los procesos ciliares permanece invariable en los estadios de 3, 6, 9 y 12 meses de edad de los ratones control (C57BL/6J) (Figura IV.13). Sin embargo, pudimos observar que la expresión de MT₁ en los ratones DBA/2J de 3 meses de edad era 2.2 veces superior a la observada en los animales control de la misma edad. Además, dicha expresión fue disminuyendo con la edad del animal y la progresión de la patología, alcanzándose los niveles mínimos a los 12 meses de edad, donde la expresión de MT₁ fue similar a la observada en los animales control (1.7 veces inferior a la existente en los ratones de DBA/2J de 3 meses de edad).

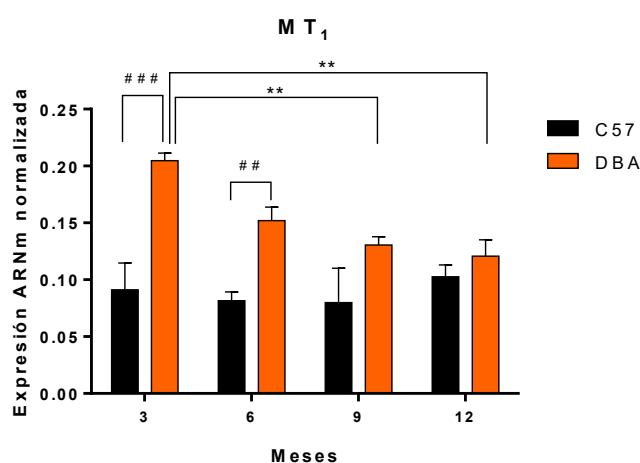


Figura IV.13.- Patrón temporal de los niveles de ARNm de MT₁ en los procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

El ARN total de los procesos ciliares tanto del control (C57BL/6J) como del glaucomatoso (DBA/2J) a los 3, 6, 9 y 12 meses de edad fue extraído, cuantificado y retrotranscrito como se describe en métodos. El receptor GAPDH fue usado como control endógeno. Los resultados corresponden a la media de 24 animales de cada cepa. **p<0.01 respecto a los 3 meses de edad de la propia cepa. ##p<0.01 y ###p<0.001 respecto a la cepa control (C57BL/6J).

2.2. EL RECEPTOR MT₂

El patrón de expresión del receptor MT₂ en los procesos ciliares fue muy similar al observado para el receptor de melatonina MT₁. Como se observa en la figura IV.14, los niveles de transcrito del receptor MT₂ permanecieron constantes en los animales control C57BL/6J a lo largo de la edad. En los animales glaucomatosos de 3 meses de edad, la expresión de MT₂ fue 8.9 veces superior a la observada en los ratones control, sufriendo un descenso muy significativo con la edad de los animales y el avance de la patología hasta alcanzar el mínimo a los 12 meses de edad, donde la expresión de MT₂ fue comparable a la observada en los ratones C57BL/6J (casi 10 veces inferior que el observado en los ratones de DBA/2J de 3 meses de edad).

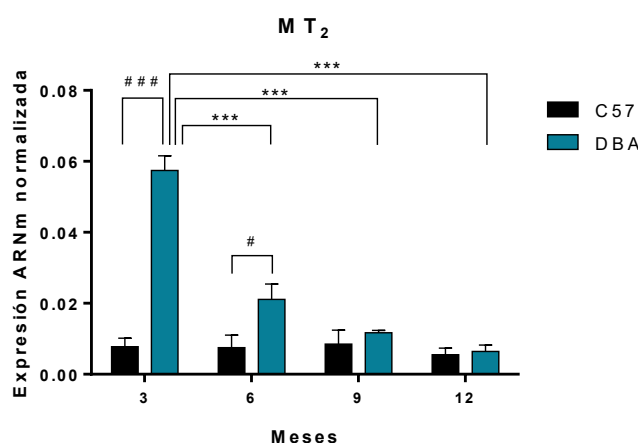


Figura IV.14.- Patrón temporal de los niveles de ARNm de MT₂ en los procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

El ARN total de los procesos ciliares tanto del control (C57BL/6J) como del glaucomatoso (DBA/2J) a los 3, 6, 9 y 12 meses de edad fue extraído, cuantificado y retrotranscrito como se describe en métodos. El receptor GAPDH fue usado como control endógeno. Los resultados corresponden a la media de 24 animales de cada cepa. ***p<0.001 respecto a los 3 meses de edad de la propia cepa. #p<0.05 y ###p<0.001 respecto a la cepa control (C57BL/6J).

2.3. EL RECEPTOR GPR50

De forma análoga, se compararon los niveles de expresión de GPR50 en los procesos ciliares de ratones control y glaucomatosos. En los ratones C57BL/6J, la expresión de GPR50 permaneció invariable durante toda la vida adulta de los animales (Figura IV.15). Por el contrario, la expresión de GPR50 a los 3 meses de edad en el ratón DBA/2J fue 4 veces superior a la de los ratones control, para ir descendiendo posteriormente con la edad y el avance de la patología hasta alcanzar los niveles de los animales control, siendo el mínimo de expresión a los 12 meses de edad (2.5 veces inferior al observado en los ratones de DBA/2J de 3 meses de edad).

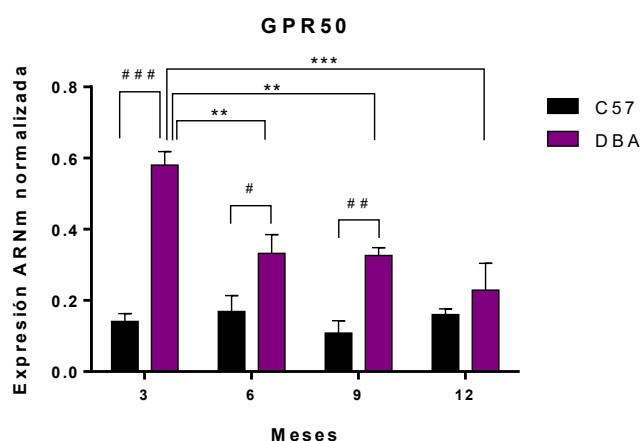


Figura IV.15.- Patrón temporal de los niveles de ARNm de GPR50 en los procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

El ARN total de los procesos ciliares tanto del control (C57BL/6J) como del glaucomatoso (DBA/2J) a los 3, 6, 9 y 12 meses de edad fue extraído, cuantificado y retrotranscrito como se describe en métodos. El receptor GAPDH fue usado como control endógeno. Los resultados corresponden a la media de 24 animales de cada cepa. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto a los 3 meses de edad de la propia cepa. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ respecto a la cepa control (C57BL/6J).

3. ESTUDIOS DE INMUNOLOCALIZACIÓN DE RECEPTORES DE MELATONINA EN RATONES C57BL/6J Y DBA/2J.

3.1. EL RECEPTOR MT₁

Los estudios inmunohistoquímicos confirmaron la presencia del receptor MT₁ en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares tanto, en los ratones C57BL/6J como en los DBA/2J. La fluorescencia fue más intensa en los animales DBA/2J a los 3 meses de edad comparado con los 12 meses de edad y con el ratón control tanto de 3 como de 12 meses (Figura IV.16A). Al realizar una cuantificación de la fluorescencia se pudo comprobar como la intensidad de marcaje en los procesos ciliares de los animales DBA/2J fue más de tres veces superior a la observada en los ratones C57BL/6J (346.3 ± 19.0 frente al 100.0 ± 1.7 , Figura IV.16B). Estos resultados coinciden con el descenso detectado en los estudios de PCR cuantitativa.

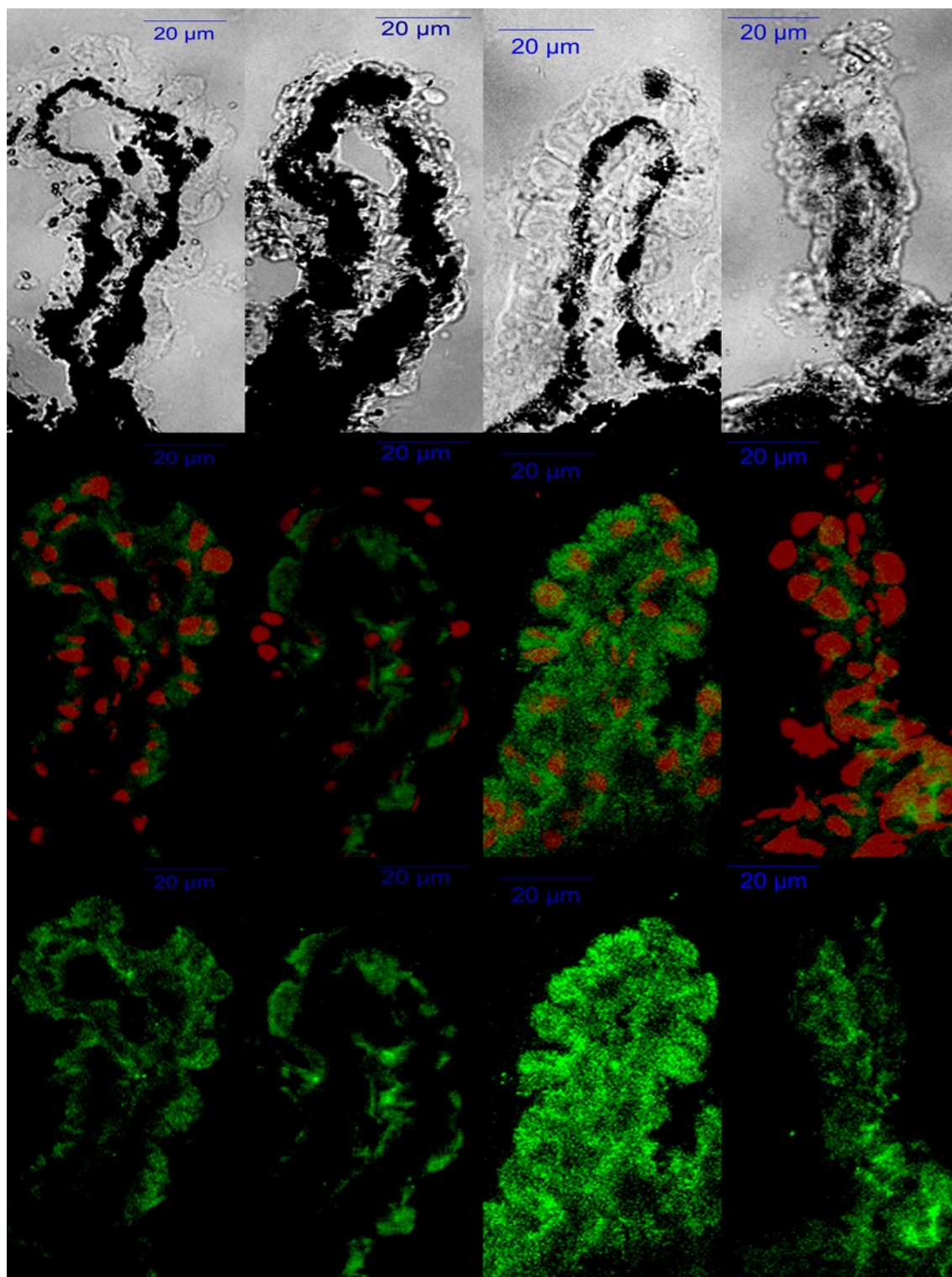


Figura IV.16A.- Distribución celular del receptor MT_1 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J (columnas izquierdas, 3 y 12 meses) frente al DBA/2J (derechas, 3 y 12 meses).

La figura muestra las imágenes de inmunofluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones en diferentes etapas de edad marcados con anticuerpos frente al receptor MT_1 (verde). Los núcleos fueron marcados con ioduro de propidio (rojo). Las imágenes de contraste de fase y confocales muestran que el inmunomarcaje del MT_1 está principalmente localizado en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares, estando aumentado en DBA/2J frente al C57BL/6J a los 3 meses de edad. Barra de escala 20 μm .

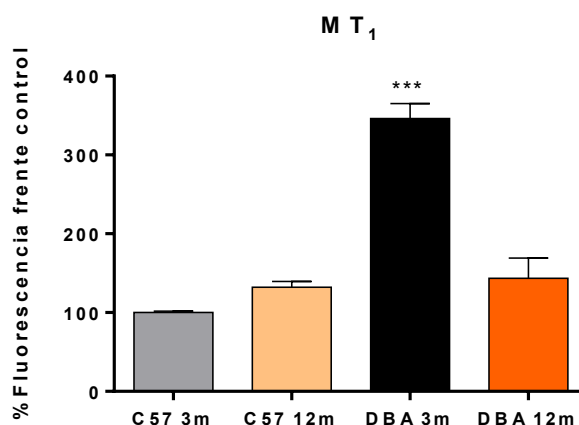


Figura IV.16B.- Cuantificación de la fluorescencia del receptor MT_1 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

La figura muestra la cuantificación relativa de la fluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones en diferentes etapas de edad. *** $p < 0.001$ respecto a los 3 meses de edad del ratón C57BL/6J.

3.2. EL RECEPTOR MT_2

Los estudios inmunohistoquímicos también han confirmado la presencia del receptor MT_2 en el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar de ambas cepas de ratones. Es más, como se pudo observar al analizar la expresión del transcrito correspondiente (Figura IV.17A), la expresión del receptor MT_2 fue significativamente mayor en los animales DBA/2J de tres meses comparados con ratones de mayor edad y, a su vez, comparados con los animales C57BL/6J de 3 y 12 meses de edad. Al realizar una cuantificación de la fluorescencia se pudo comprobar cómo la intensidad de marcaje observada en los procesos ciliares de los ratones DBA/2J fue casi dos veces superior a la de los animales control C57BL/6J (175.5 ± 21.2 frente al 100.0 ± 8.1 , Figura IV.17B).

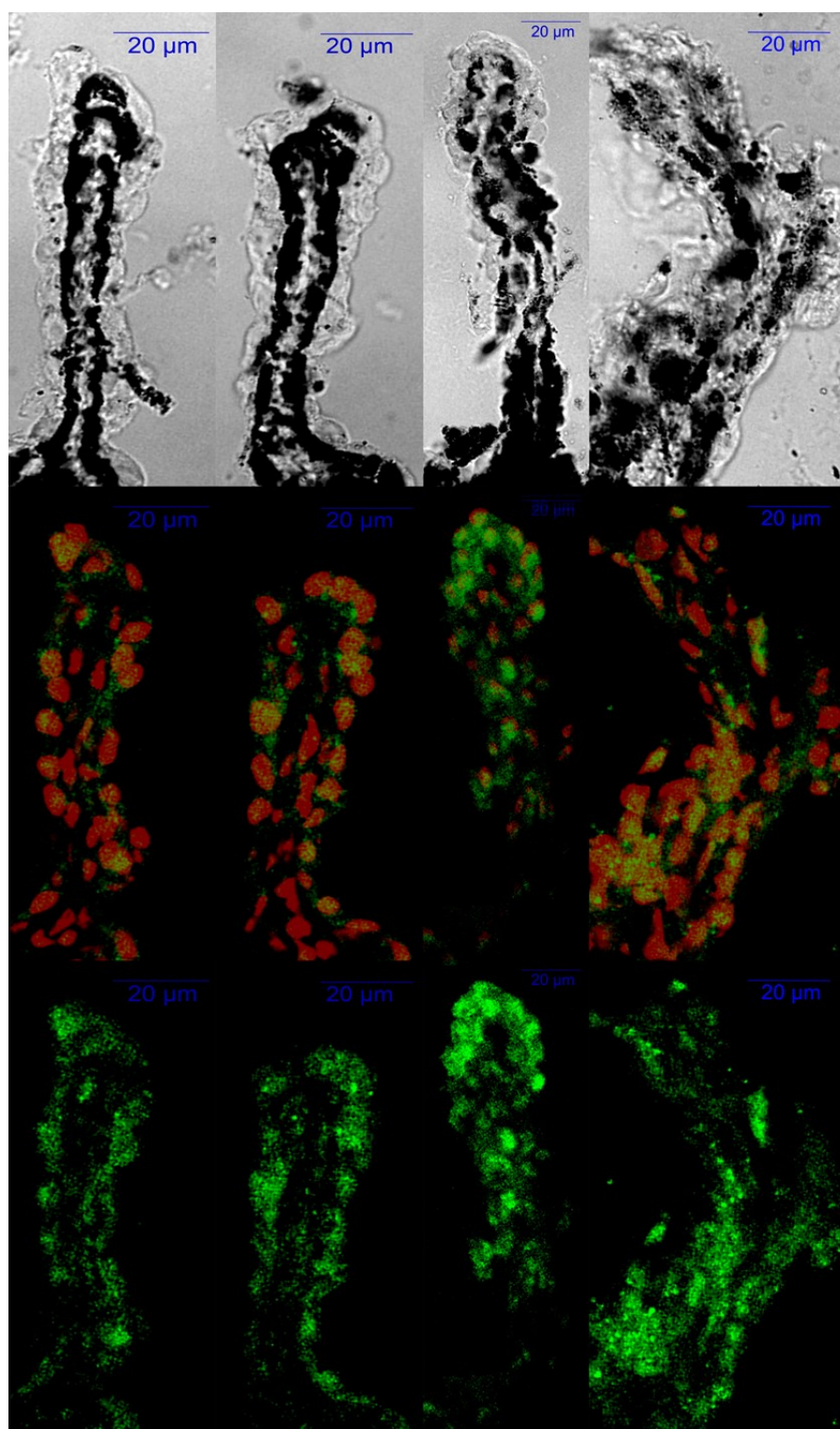


Figura IV.17A.- Distribución celular del receptor MT_2 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J (columnas izquierdas, 3 y 12 meses) frente al DBA/2J (derechas, 3 y 12 meses).

La figura muestra las imágenes de inmunofluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones en diferentes etapas de edad marcados con anticuerpos frente al receptor MT_2 (verde). Los núcleos fueron marcados con ioduro de propidio (rojo). Las imágenes de contraste de fase y confocales muestran que el inmunomarcaje del MT_2 está principalmente localizado en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares, estando especialmente aumentado en DBA/2J frente al C57BL/6J a los 3 meses de edad. Barra de escala 20 μm .

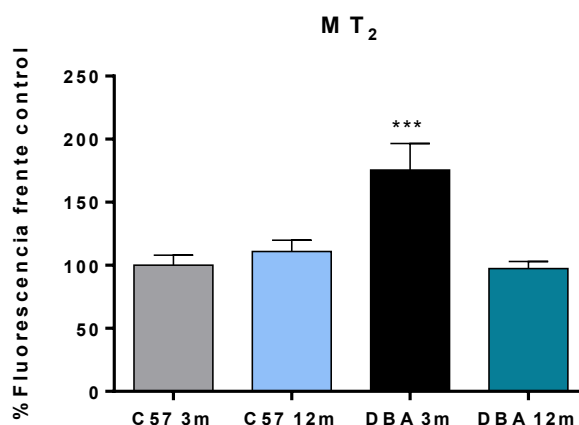


Figura IV.17B.- Cuantificación de la fluorescencia del receptor MT₂ en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

La figura muestra la cuantificación relativa de la fluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones en diferentes etapas de edad. *** $p < 0.001$ respecto a los 3 meses de edad del ratón C57BL/6J.

3.3. EL RECEPTOR GPR50

Los estudios de inmunohistoquímica también revelaron que el receptor GPR50 se encuentra ampliamente distribuido por todo el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares del ojo de ambos ratones. Coincidiendo con lo observado en los estudios de qPCR, la expresión del receptor GPR50 también fue superior en los animales DBA/2J de 3 meses de edad, comparado con los de 12 meses de edad y comparados también con los ratones C57BL/6J de 3 y 12 meses de edad (Figura IV.18A). Al realizar una cuantificación de la fluorescencia se pudo comprobar como la intensidad de marcaje en los procesos ciliares de los animales DBA/2J es más de dos veces superior a la observada en los ratones C57BL/6J (224.8 ± 23.8 frente al 100.0 ± 13.1 , Figura IV.18B).

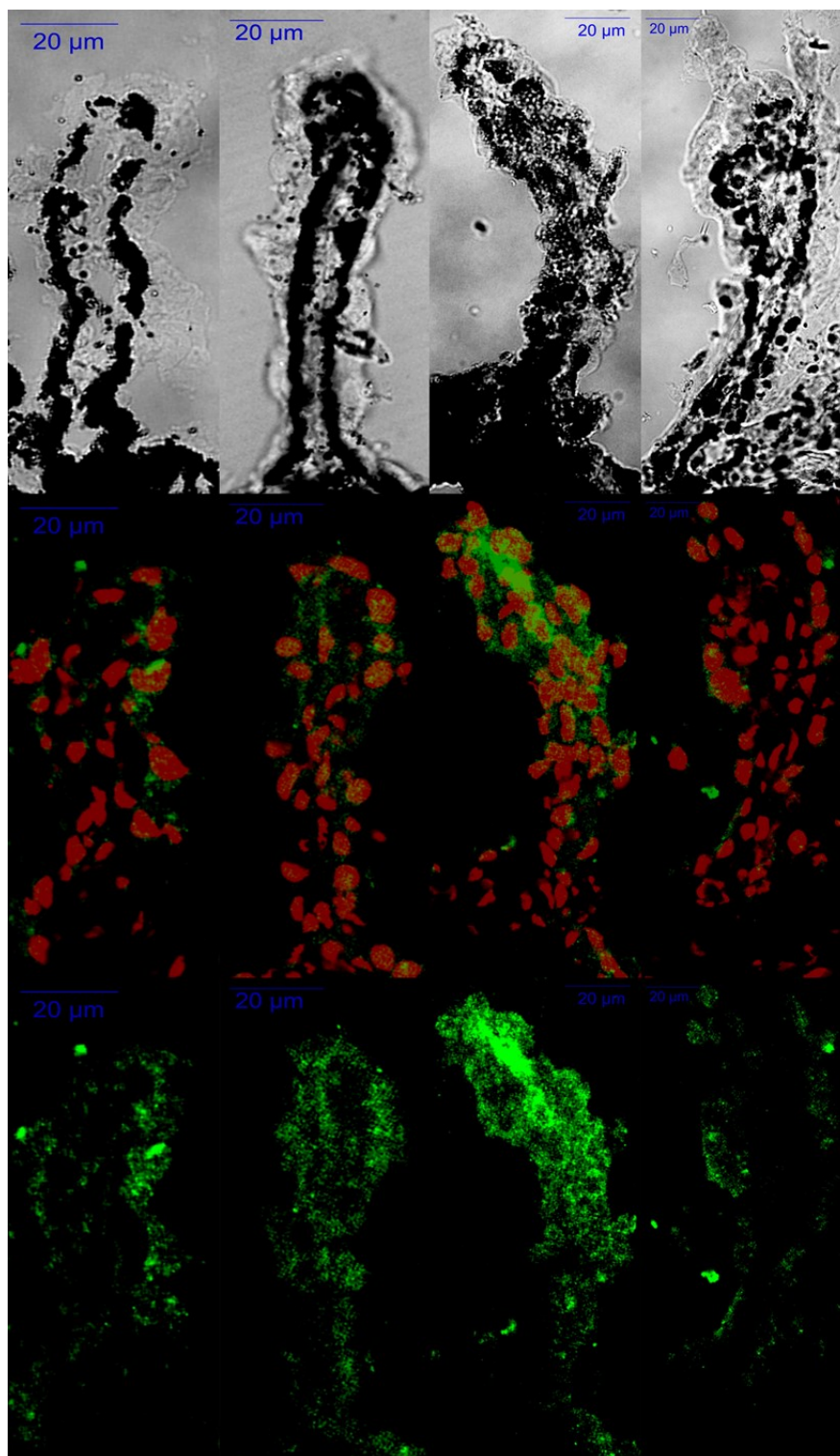


Figura IV.18A.- Distribución celular del receptor GPR50 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J (columnas izquierdas, 3 y 12 meses) frente al DBA/2J (derechas, 3 y 12 meses).

La figura muestra las imágenes de inmunofluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones en diferentes etapas de edad marcados con anticuerpos frente al receptor GPR50 (verde). Los núcleos fueron marcados con ioduro de propidio (rojo). Las imágenes de contraste de fase y confocales muestran que el inmunomarcaje del GPR50 está principalmente localizado en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares, estando aumentado en DBA/2J frente al C57BL/6J a los 3 meses de edad. Barra de escala 20 µm.

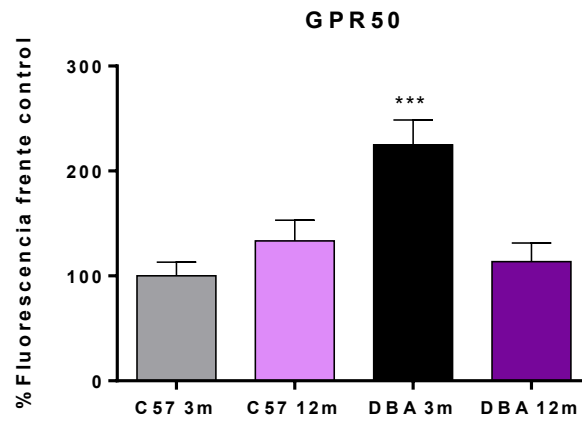
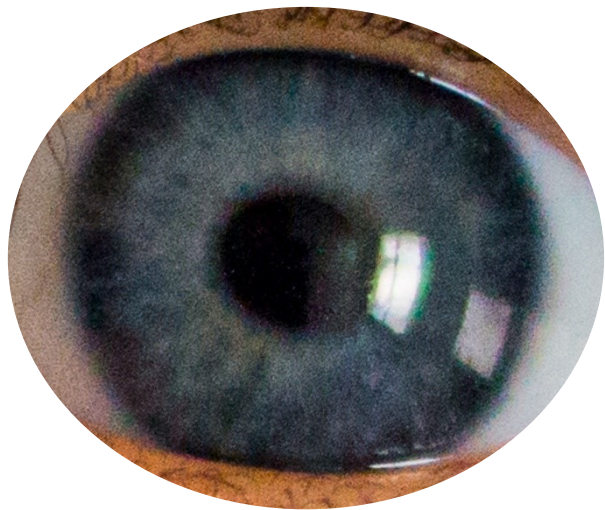


Figura IV.18B.- Cuantificación de la fluorescencia del receptor GPR50 en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

La figura muestra la cuantificación relativa de la fluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones en diferentes etapas de edad. *** $p < 0.001$ respecto a los 3 meses de edad del ratón C57BL/6J.



DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El principal objetivo de la presente tesis ha sido profundizar en el conocimiento y la caracterización de los receptores de melatonina en la hipertensión ocular. En ella, se describe el efecto sobre la PIO de la melatonina y sus análogos, 5-MCA-NAT y agomelatina en diferentes modelos animales, así como los receptores implicados en la bajada de la PIO.

La melatonina y sus análogos se han identificado como moléculas activas capaces de reducir la PIO en diferentes modelos animales al activar receptores de melatonina (Pintor et al., 2003, Serle et al., 2004, Alarma-Estrany et al., 2011, Martinez-Aguila et al., 2013, Martinez-Aguila et al., 2016).

Los resultados obtenidos en los conejos albinos de la raza Nueva Zelanda han demostrado como los tres compuestos melatoninérgicos estudiados en esta tesis, son capaces de reducir la PIO en condiciones normotensas e hipertensas.

En el caso de la agomelatina en este modelo animal, su acción está mediada a través de los receptores de melatonina MT₂ y MT₃, siendo los antagonistas probados incapaces de revertir por completo el efecto de agomelatina.

Como se ha explicado anteriormente, la agomelatina es un derivado de la melatonina, el cual es empleado actualmente para el tratamiento de la depresión (De Berardis et al., 2011) con el nombre comercial de Valdoxan®, Melitor® y Thymanax®, que tiene una alta afinidad por los receptores MT₁ y MT₂ (Conway et al., 2000) y a la vez es un antagonista no selectivo del receptor de serotonina 5-HT_{2C} (Millan et al., 2003). En base a nuestros resultados, su efecto fue antagonizado parcialmente por el antagonista del receptor MT₂ 4PPDOT y también fue bloqueado parcialmente por el antagonista del receptor MT₃, prazosin (Pintor et al., 2003). Dado que el antagonista prazosin también bloquea el receptor adrenérgico α_1 , se comprobó que dicho efecto no estaba mediado a través de dicho receptor dado que el antagonista selectivo de este

receptor, corinantina, no afecta significativamente al efecto hipotensor de la agomelatina.

Cuando se compara la agomelatina con otros análogos de melatonina en su habilidad de reducir la PIO en conejos albinos de la raza Nueva Zelanda en condiciones normotensas, se demuestra que es más potente que otros mencionados en la literatura científica (Alarma-Estrany et al., 2011).

Si comparamos la agomelatina con la melatonina y el 5-MCA-NAT, se observa que la primera es algo mejor que la melatonina y significativamente mejor que 5-MCA-NAT en términos de EC_{50} . Por el contrario, agomelatina reduce la PIO menos que el 5-MCA-NAT dado que este último disminuye la PIO casi un 60%, mientras que la agomelatina sólo un 20% (Crooke et al., 2012).

Bajo las condiciones hipertensas el 5-MCA-NAT fue el mejor compuesto reduciendo la PIO (71%) y la agomelatina fue más efectiva (47%) que melatonina (23%).

La explicación de esta diferencia no es obvia. Considerando los perfiles farmacológicos de los análogos de melatonina probados, la melatonina no es tan activa sobre el receptor MT_3 como 5-MCA-NAT y agomelatina (Pintor et al., 2003). El incremento de actividad de la agomelatina y el 5-MCA-NAT, comparado con la melatonina, bajo condiciones hipertensas, podría ser debido a un incremento de actividad del receptor de melatonina MT_3 debido al aumento de presión. La modulación de la actividad de un receptor por presión hidrostática ha sido descrita para la acetilcolina (Heinemann et al., 1987) y los receptores de interleukina-1 (Seefeldt et al., 2007) como una acción directa de una presión elevada. De la misma forma, se ha demostrado el efecto de la presión elevada para regular la actividad de proteínas G (Siebenaller, 2003). Son necesarios más experimentos para verificar si la presión puede modificar la afinidad del receptor MT_3 sobre agentes melatoninérgicos.

Cuando se compara la agomelatina con compuestos comerciales, se comprueba que es tan efectiva como muchos de ellos. Está claro que es necesario encontrar la concentración óptima y el mejor vehículo para su administración, tal y como ha ocurrido

para otros análogos (Andres-Guerrero et al., 2011). Sin embargo, y con estas limitaciones, el efecto de este análogo de la melatonina fue comparable con latanoprost y brimonidina (agonista del receptor de prostaglandinas y adrenérgicos α_2 , respectivamente) en un modelo normotenso. Sólo el inhibidor de anhidrasas carbónicas dorzolamida y el betabloqueante timolol, fueron mejores que agomelatina reduciendo la PIO en nuestro modelo animal normotenso.

Cuando los experimentos fueron realizados bajo condiciones hipertensas, la posición de Trendelenburg produjo un aumento de la PIO que fue máximo a los 5 minutos tras la colocación en dicha posición, alcanzando los $172.5 \pm 9.7\%$ comparados con el mismo conejo en posición horizontal. Un punto importante que destacar es que la agomelatina es más efectiva reduciendo la PIO en condiciones hipertensas, que en condiciones normotensas. Mientras que en animales colocados en posición prona es capaz de reducir la PIO casi un 20%, en la posición de Trendelenburg produce un descenso del 47%. Esto es reseñable dado que indica que la eficacia de este análogo de la melatonina mejora su eficacia bajo condiciones hipertensas. El mismo comportamiento se ha observado para los compuestos comerciales dorzolamida y timolol cuando se aplican en ambas condiciones. En este sentido, la dorzolamida y el timolol fueron mejores reduciendo la PIO en condiciones hipertensas que bajo condiciones normotensas (ver Tabla IV.1).

Caracterización farmacológica de la melatonina y el 5-MCA-NAT en un modelo murino de glaucoma.

Al realizar los experimentos sobre dichos ratones se comprobó que tanto la melatonina como sus análogos el 5-MCA-NAT y la agomelatina fueron capaces de reducir la PIO tanto en ratones glaucomatosos como en modelos murinos no glaucomatosos. El resultado presentado en la presente Tesis indica que los 3 compuestos pueden reducir significativamente la PIO en los ratones DBA/2J cuando los animales son tratados con estos compuestos en el momento en el que su PIO es más

alta. Un efecto similar puede observarse en los ratones control C57BL/6J, aunque en este modelo no haya un incremento de PIO con el avance de la edad, como ocurre con el modelo glaucomatoso. Cabe destacar que el efecto hipotensor de la melatonina es más profundo en el modelo glaucomatoso que en el control (19% frente a 33%), y este efecto también está presente cuando se usa tanto 5-MCA-NAT (20% frente a 29%), como agomelatina (17% frente a 29%) (Figura IV.8).

Al realizar una caracterización farmacológica de la melatonina y el 5-MCA-NAT se hace especialmente evidente las diferencias entre ambos tipos de ratones en las curvas de dosis respuesta. La reducción en el ratón glaucomatoso es más marcada que en aquella obtenida en los animales control. Hay un punto interesante que requiere algunas consideraciones. Cuando se estudian las curvas de dosis respuesta para la melatonina y el 5-MCA-NAT en los animales DBA/2J, no es posible alcanzar los valores de PIO basal que estos animales tenían antes del comienzo de la patología, ni los valores que presentan a los 12 meses de edad en el modelo normotenso (C57BL/6J). Esto indica que las dosis máximas aplicadas, aunque reducen la PIO, no son suficientes para retornar la PIO a valores de antes del comienzo de la patología. Este hecho puede sugerir que, aunque los mecanismos para reducir la PIO existen (Pintor et al., 2001, Ismail and Mowafi, 2009, Martinez-Aguila et al., 2013), como pasa en otros modelos, el sistema no puede devolver a las condiciones de presión que existían antes del comienzo de la patología. No está claro por qué la PIO no alcanza valores más bajos, pero, de hecho, se ha demostrado que, en condiciones glaucomatosas, a parte del daño retiniano causado, dicho daño puede afectar a las estructuras que producen y drenan el humor acuoso (cuerpo ciliar y malla trabecular). Los factores ambientales como la hipoxia o un incremento agudo de la presión hidrostática conducen a unos procesos inflamatorios y alteraciones en señales apoptóticas que crean una cascada de muerte celular en estructuras de la cámara anterior (Zhou et al., 2005). Otro punto a tener en cuenta es que el modelo glaucomatoso DBA/2J se basa en una despigmentación del iris que bloquea la salida del humor acuoso. Este hecho implica que, aunque se frene la

producción del humor acuoso con los compuestos melatoninérgicos, no es posible aumentar el drenaje debido a ese bloqueo. Esto hace que sea más difícil alcanzar valores de PIO muy bajos, o similares a los que presentaban antes del inicio de la patología. Éstas pueden ser las razones por las que en un estado tan avanzado de la patología glaucomatosa la melatonina y sus análogos sean incapaces de devolver completamente a valores iniciales la PIO. Como se ha indicado, todos los experimentos fueron llevados a cabo en el pico de presión entre los 10 y 12 meses de edad, aunque los cambios en PIO son detectables a los 9 meses de edad (Perez de Lara et al., 2014).

Con respecto a la farmacología y según el perfil de los antagonistas de la melatonina, algunos comentarios pueden ser pertinentes, pero es necesario tener en cuenta que los antagonistas han sido probados en una sola dosis y, por lo tanto, se podría encontrar algunos cambios si se hiciera una caracterización completa con los mismos. Nuestra experiencia en otras especies (conejo) ha demostrado que no observamos cambios en los receptores implicados en las acciones de melatonina y 5-MCA-NAT cuando se usan dosis únicas de antagonistas o cuando se caracterizaron usando valores pA_2 (Pintor et al., 2003). Sin embargo, se necesita una caracterización completa y trabajar más en este respecto. Con respecto al perfil observado usando concentraciones únicas de antagonistas de receptores de melatonina, parece que los efectos de los antagonistas probados luzindol (no selectivo), 4-PPDOT (MT_2) y prazosin (MT_3), muestran que el bloqueo de las acciones de melatonina y 5-MCA-NAT no son idénticas en ambas cepas de ratones. De acuerdo con los resultados actuales, sólo en el ratón glaucomatoso DBA/2J fue posible observar algunas diferencias. El efecto de la melatonina fue revertido por cualquiera de los antagonistas probados en el C57BL/6J y sólo el prazosin no pudo revertir por completo el efecto de la melatonina en el DBA/2J. Esto sugiere que, en este modelo, la presencia de un supuesto receptor de MT_3 es improbable. Por otro lado, fue posible ver más diferencias en el efecto de 5-MCA-NAT en los dos modelos en estudio. Mientras que en el C57BL/6J todos los antagonistas de receptores de melatonina probados revirtieron el efecto de 5-MCA-NAT, en el DBA/2J

sólo ligeramente luzindol y particularmente el antagonista de MT₂, 4-PPDOT pudieron revertirlo. 5-MCA-NAT se ha reivindicado como un agonista del putativo receptor de melatonina MT₃ (Molinari et al., 1996) (Pintor et al., 2001) (Serle et al., 2004). Los resultados actuales indican que esta sustancia actúa también sobre los receptores MT₂. No es la primera vez que se informa que esta acción se produce a través de los receptores MT₂ de melatonina. De hecho, se ha sugerido que este compuesto pueda actuar a través de receptores MT₂ en algunos modelos y, por lo tanto, no deba considerarse tan selectivo (Vincent et al., 2010). Además, y en relación con los cambios de la PIO, se ha observado que 5-MCA-NAT puede producir su acción hipotensora activando un receptor MT₂ aparte del receptor de melatonina MT₃ previamente sugerido (Alarma-Estrany et al., 2011).

Tratamiento continuado con 5-MCA-NAT en un modelo murino de glaucoma.

En base al estudio farmacológico y al estudio de la evolución de la PIO en los ratones glaucomatosos, se decidió realizar este estudio aplicando 5-MCA-NAT a los ratones de un modo continuado. Para ello, se escogieron al azar 20 animales de 5 meses de edad de capa cepa y se dividieron en dos grupos, control y tratados. Hay que destacar que, a los 5 meses de edad, la PIO de los ratones DBA/2J es similar a la del ratón C57BL/6J, por lo que no es posible saber a qué edad le subirá la PIO, ya que muestran diferencias entre ratones de la misma cepa. Esto hace que los grupos sean más homogéneos todavía. Al grupo tratado se les aplicó 5-MCA-NAT 3 veces a la semana durante 3 meses, desde el sexto al noveno mes. Estos experimentos demuestran una clara tendencia del 5-MCA-NAT a contrarrestar el aumento de la PIO observado en los animales no tratados. Aunque parece existir un efecto aparente desde la semana octava de tratamiento, no es estadísticamente significativo hasta las 2 últimas semanas. Es muy probable que con una aplicación diaria de este análogo de la melatonina y/o usando un número mayor de animales, los errores fueran menores y, en

consecuencia, las diferencias serían estadísticamente significativas más cerca del comienzo de aplicación del 5-MCA-NAT.

Si esto pasara, la presión se contralaría mejor, y la evolución de la patología se pararía como pasa con otros tratamientos farmacológicos (Bhowmik, 2012).

Aunando los experimentos realizados en ambos tipos de modelos animales, se ha demostrado la importancia de la melatonina y sus receptores en la regulación de la PIO y presumiblemente en la participación de la fisiopatología del glaucoma (Alcantara-Contreras et al., 2011, Tosini et al., 2013).

En este contexto, los resultados mostrados contribuyen a la misma idea mostrando que la melatonina y el 5-MCA-NAT aplicados en un modelo de glaucoma que desarrolla la patología sin modificaciones quirúrgicas, físicas o químicas, puede reducir la PIO en el modelo hipertensivo.

Se ha descrito la acción de estos dos compuestos en animales normotensos como los conejos (Pintor et al., 2001, Pintor et al., 2003), o en condiciones hipertensas (Serle et al., 2004, Martinez-Aguila et al., 2013). La bajada de la PIO en modelos de hipertensión como los monos presentaron un patrón de reducción que fue distinto del observado en el presente modelo exfoliativo. En el modelo primate se necesitaban hasta 3 días para observar reducciones de la PIO que fueran estadísticamente significativas (Serle et al., 2004). Este retraso, comparado con el efecto que se ha descrito en el presente trabajo puede ser debido, a parte de las diferencias entre especies y el modelo de hipertensión que difiere entre ambas especies (despigmentación frente laser fotocoagulador), al efecto a largo plazo que la melatonina y sus análogos ejercen sobre la PIO. Estos efectos a largo plazo se han descrito en el ojo, los cuales están debido principalmente a las modulación de los receptores de anhidrasa carbónicas y a la regulación de la expresión de los receptores adrenérgicos (Crooke et al., 2011, Crooke et al., 2012, Crooke et al., 2013). Con esta información se ha demostrado no sólo el efecto agudo y a largo plazo del 5-MCA-NAT en la PIO si no que un tratamiento durante

3 meses en una situación de glaucoma ayuda a aminorar la elevación de la PIO en nuestro modelo murino de glaucoma.

Otro aspecto que es importante es comparar los resultados obtenidos con trabajos previos descritos en la literatura con respecto a la dosis y efectos observados. Por ejemplo, en pacientes con cataratas tratados con melatonina se pudo demostrar que las dosis orales de 10 mg pueden reducir la PIO 23% (Ismail and Mowafi, 2009). Estos autores sólo utilizan melatonina una vez, y además los pacientes son normotensos, y aun así la PIO se reduce significativamente. En el presente caso, la melatonina y la 5-MCA-NAT se aplican tópicamente y se realizan tantos experimentos agudos y a largo plazo. En valores absolutos, la reducción de la PIO cuando se aplica melatonina en la superficie ocular fue un 13% más efectiva que la de los seres humanos (23% de reducción en humanos normotensos vs. 32% en ratones glaucomatosos). Es necesario tener en cuenta que ambos mecanismos de administración proporcionarán concentraciones locales diferentes de melatonina, aunque la cantidad que es aplicada tópicamente por nosotros es de aproximadamente 50 ng.

El tratamiento con la agomelatina en seres humanos glaucomatosos parece estar más cerca de nuestra idea de usar melatonina o análogos para reducir la PIO en ratones glaucomatosos. Como se ha comentado anteriormente, los autores proporcionaron una dosis diaria de 25 mg, y consiguieron una reducción promedio de la PIO del 30% a los 15 días después de iniciar el tratamiento y manteniéndose estable durante otros 15 días (Pescosolido et al., 2015). En nuestro caso, el tratamiento con 5-MCA-NAT reduce la PIO sólo un 14% en comparación con los animales glaucomatosos no tratados, que no es una bajada tan marcada como la obtenida con agomelatina. La diferencia, aparte del mecanismo de administración, puede basarse en el hecho de que aplicamos 5-MCA-NAT 3 veces a la semana y no diariamente. Podría ser el caso que, si aplicamos el agente melatoninérgico más a menudo, los resultados en el tratamiento crónico aparecerían más temprano después de iniciarlo y la reducción de la PIO podría ser más fuerte. Sin embargo, el modelo más cercano al 5-MCA-NAT fue el realizado por

Serle y sus compañeros de trabajo (Serle et al., 2004). En este modelo, el compuesto se aplicó tópicamente en un volumen de 25 μ l al 2% (aproximadamente 0,5 mg, equivalente a 73 mM) dos veces al día durante 5 días. En este caso, la PIO reducción fue del 20%. Comparativamente, nuestros resultados se obtuvieron con una concentración significativamente muy inferior de agentes melatoninérgicos que los aplicados en monos glaucomatosos. Es necesario aclarar que dichos animales fueron tratados con láser de fotocoagulación en la malla trabecular, por lo que dichas estructuras están alteradas. Parece claro que es necesario estudiar tanto la dosis más efectiva como la posología necesaria para obtener los mejores resultados.

Un aspecto interesante a tener en cuenta son las aparentes altas concentraciones utilizadas para tratar los animales tanto para agonistas como para antagonistas. La fisiología ocular en relación con el drenaje lagrimal junto con la capacidad de las moléculas para pasar a través de la córnea (dependiendo de sus propiedades químicas), son pasos limitantes para la administración ocular de fármacos. Se ha demostrado que, con el fin de obtener concentraciones farmacológicamente activas de agonistas y antagonistas de melatonina en el humor acuoso, es necesario aplicarlos de forma tópica en concentraciones del rango micromolar como se ha descrito anteriormente (Alarma-Estrany et al., 2009). Por lo tanto, las concentraciones utilizadas son suficientes para estimular los receptores de melatonina dentro del ojo. Este aspecto es muy relevante cuando se trata de antagonistas, especialmente prazosin, que ha sido clasificado además de antagonista de MT_3 , del receptor adrenérgico α_1 (Stokes and Weber, 1974). Dado que el adrenorreceptor mencionado puede contribuir a la regulación de la PIO como se describió anteriormente (Pintor, 2009), podría ser que la aplicación de prazosin pueda reflejar una acción sobre los receptores adrenérgicos α_1 , en lugar de sobre receptor MT_3 de melatonina. Para aclarar este punto, en un artículo reciente hemos descrito que cuando prazosin se aplica tópicamente a concentraciones micromolares, la concentración intraocular de este antagonista está actuando

principalmente en el receptor de melatonina MT₃ en lugar de en el α_1 adrenérgico, descartando la posible interacción con el receptor adrenérgico (Huete-Toral et al., 2015).

Localización de los receptores de melatonina en cuerpo ciliar y variación en el tiempo de la expresión de los genes de melatonina en ratones controles y glaucomatosos

Para alcanzar este objetivo, se analizaron los cambios de expresión en los receptores de melatonina, MT₁, MT₂ y la proteína GPR50 en el cuerpo ciliar de un modelo de glaucoma, el ratón DBA/2J. En comparación con los animales control, la cepa de ratones C57BL/6J, el DBA/2J presentó una clara reducción en la expresión de todos los receptores estudiados, que disminuyeron concomitantemente con el avance de la patología.

La importancia de los receptores de melatonina en el cuerpo ciliar está relacionada con su papel en el control de la homeostasis del humor acuoso. La presencia de melatonina MT₁, MT₂ y los receptores MT₃ putativos en el cuerpo ciliar se han descrito en varios modelos (Alarma-Estrany and Pintor, 2007, Wiechmann and Summers, 2008, Pintor et al., 2003, Serle et al., 2004) regulando la producción y el drenaje del humor acuoso. Para su activación es necesaria la presencia de melatonina en el humor acuoso. La presencia de melatonina en este líquido se conoce desde mediados de los años 90 (Osborne, 1994, Osborne and Chidlow, 1994). Varios autores han estudiado los niveles de melatonina en él (Chiquet et al., 2006, Martin et al., 1992), pero sólo recientemente se ha podido demostrar que en el caso de PIO elevada, las concentraciones de melatonina también son altas. Los cambios relacionados con la hipertensión ocular se han observado en humanos y también en los ratones DBA/2J, donde los niveles de melatonina en el humor acuoso se encuentran aumentados 4 veces (Alkozi et al., 2017a). Este incremento de la concentración de melatonina junto con la elevación de la PIO está sugiriendo algún tipo de desacoplamiento entre la melatonina y sus receptores, ya que como se ha mencionado anteriormente la aplicación de

melatonina y sus derivados puede reducir la PIO tanto en modelos normotensos como hipertensos, incluido el ratón DBA/2J (Pintor et al., 2003, Martínez-Aguila et al., 2016).

En el caso de las condiciones hipertensas oculares, se ha demostrado recientemente el papel de un canal TRPV4 en el control de la síntesis de melatonina en el cuerpo ciliar (Alkozi and Pintor, 2015). Este canal actúa como un sensor de presión que puede estimular la expresión de la enzima clave en la síntesis de melatonina, la arakilamina N-acetiltransferasa (AANAT) (Alkozi et al., 2017c), así como su fosforilación, ambos mecanismos que promueven la síntesis de melatonina en el cuerpo ciliar (Alkozi et al., 2017b).

Los presentes resultados aportan algo de luz para explicar por qué los niveles de melatonina elevados en los ratones glaucomatosos siguen teniendo una PIO alta. En este sentido, hemos demostrado una reducción en la expresión de los receptores de melatonina en el cuerpo ciliar que puede explicar por qué, aunque las concentraciones en el humor acuoso de esta sustancia se incrementan, no es suficiente para reducir la PIO. Esta disminución en los receptores de melatonina con la edad, se ha encontrado también en las retinas de ratones C3H- $f^{+/+}$, un modelo de ratón productor de melatonina (Baba et al., 2012)

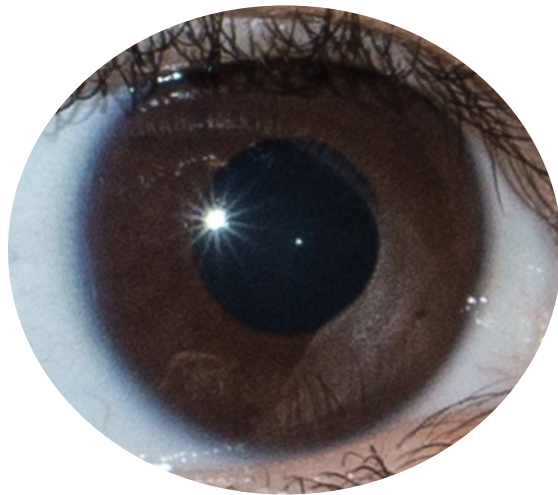
Entre las tres proteínas investigadas, el receptor de melatonina MT₂ parece ser el más afectado por la reducción de sus niveles de expresión. Esto puede explicar, en parte, por qué la melatonina endógena es incapaz de reducir la PIO, sin embargo, también deben tenerse en cuenta los cambios en los receptores MT₁ de la melatonina. Los experimentos realizados en ratones deficientes en MT₁, mostraron elevaciones claras en la PIO (Alcantara-Contreras et al., 2011), con graves cambios en la supervivencia de las células ganglionares de la retina (Tosini et al., 2013). Además, es importante tener en cuenta que el receptor huérfano GPR50, que comparte el 45% de homología con receptores de melatonina, tiene una estrecha relación con los receptores de melatonina. Aunque el GPR50 no parece ser un receptor de melatonina, estando más relacionado con el metabolismo energético (Ivanova et al., 2008), puede formar

heterodímeros con los receptores MT₁ y MT₂ (Levoye et al., 2006). Como resultado, de tal dimerización, la actividad del receptor de melatonina MT₁ se inhibe mientras que el dímero con el MT₂ no modifica su actividad (Jockers et al., 2008). Dado que en la presente Tesis la expresión de GPR50 disminuye con el desarrollo de la patología en la misma proporción que el receptor MT₁, y considerando los comentarios anteriores sobre la heteromerización, el receptor MT₁ de melatonina estaría en desventaja, tanto por la reducción de su expresión como por la posible dimerización con la proteína GPR50.

En resumen, la expresión de los receptores de melatonina decae con el desarrollo de la patología glaucomatosa. Esto implica que el efecto hipotensor fisiológico de la melatonina reduciendo la PIO ya no es posible en dicha condición. Una solución para estos cambios en la expresión de los receptores es la aplicación exógena de melatonina o cualquiera de sus análogos para permitir la activación de los restantes receptores de melatonina.

La administración de melatonina, 5-MCA-NAT o agomelatina en un modelo exfoliativo de glaucoma tiene un efecto hipotensor agudo. Además, tenemos evidencias que apuntan a que la aplicación de 5-MCA-NAT regularmente a lo largo del desarrollo de la enfermedad reduce la elevación progresiva de la PIO observada en este modelo de glaucoma. Hay que destacar el papel no sólo de bajada de la PIO de los compuestos melatoninérgicos, si no el papel neuroprotector de los mismos. Se ha demostrado la eficacia de la melatonina y la agomelatina en la protección de los daños oxidativos retinianos causados por el glaucoma (Gressens et al., 2008, Srinivasan et al., 2011, Wongprayoon and Govitrapong, 2017, Ramos et al., 2017, Chumboatong et al., 2017)

Todos estos efectos positivos protegerían a la retina del desarrollo ulterior de la patología, lo que hace que estos compuestos melatoninérgicos puedan expandir el repertorio actual de medicamentos usados para el tratamiento de la hipertensión ocular y puedan situarse como potenciales medicamentos para el tratamiento del glaucoma, tanto para el tratamiento de la PIO como para la protección retiniana necesaria.

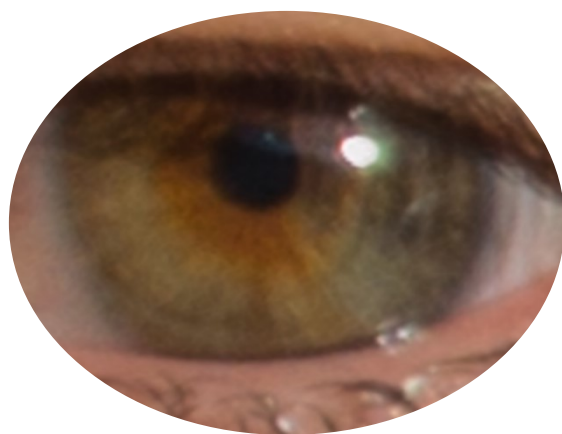


CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

El objetivo de esta tesis ha sido profundizar en el conocimiento y la caracterización de los receptores de melatonina en la hipertensión ocular. Por lo tanto, de la presente Tesis Doctoral se extraen las siguientes conclusiones:

1. Agomelatina disminuye la PIO en conejos albinos de la raza Nueva Zelanda en condiciones normotensas e hipertensas, actuando a través de los receptores de melatonina MT_2 y MT_3 .
2. En los ratones glaucomatosos DBA/2J la melatonina y sus análogos 5-MCA-NAT y agomelatina reducen la PIO en mayor medida que en los ratones controles normotensos C57BL/6J, actuando principalmente a través del receptor de melatonina MT_2 en el caso del 5-MCA-NAT.
3. El tratamiento continuado con 5-MCA-NAT, con sólo 3 aplicaciones semanales durante 3 meses, contrarresta la subida de PIO propia del ratón glaucomatoso, disminuyéndola en un 14%.
4. Existe una disminución de la expresión de los receptores de melatonina MT_1 , MT_2 y GPR50 con la evolución de la patología glaucomatosa que impide que la melatonina endógena pueda contrarrestar el aumento de la PIO.
5. Los compuestos melatoninérgicos son unos buenos candidatos para el tratamiento del glaucoma, dado su efecto sobre la PIO y su acción neuroprotectora, aún sin la mejor formulación oftálmica.



BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AGUDO-BARRIUSO, M., NADAL-NICOLÁS, F. M., PARRILLA-REVERTER, G., VILLEGAS-PÉREZ, M. P. & VIDAL-SANZ, M. 2011. *Anatomical and Molecular Responses Triggered in the Retina by Axonal Injury*, Croacia, InTech.
- AIHARA, M., LINDSEY, J. D. & WEINREB, R. N. 2003a. Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 5168-73.
- AIHARA, M., LINDSEY, J. D. & WEINREB, R. N. 2003b. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 4314-20.
- ALARMA-ESTRANY, P., CROOKE, A. & PINTOR, J. 2009. 5-MCA-NAT does not act through NQO2 to reduce intraocular pressure in New-Zealand white rabbit. *J Pineal Res*, 47, 201-9.
- ALARMA-ESTRANY, P., GUZMAN-ARANGUEZ, A., HUETE, F., PERAL, A., PLOURDE, R., JR., PELAEZ, T., YERXA, B. & PINTOR, J. 2011. Design of novel melatonin analogs for the reduction of intraocular pressure in normotensive rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*, 337, 703-9.
- ALARMA-ESTRANY, P. & PINTOR, J. 2007. Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther*, 113, 507-22.
- ALCANTARA-CONTRERAS, S., BABA, K. & TOSINI, G. 2011. Removal of melatonin receptor type 1 increases intraocular pressure and retinal ganglion cells death in the mouse. *Neurosci Lett*, 494, 61-4.
- ALKOZI, H., SANCHEZ-NAVES, J., DE LARA, M. J., CARRACEDO, G., FONSECA, B., MARTINEZ-AGUILA, A. & PINTOR, J. 2017a. Elevated intraocular pressure increases melatonin levels in the aqueous humour. *Acta Ophthalmol*, 95, e185-e189.
- ALKOZI, H. A., PEREZ DE LARA, M. J. & PINTOR, J. 2017b. Melatonin synthesis in the human ciliary body triggered by TRPV4 activation: Involvement of AANAT phosphorylation. *Exp Eye Res*.
- ALKOZI, H. A., PEREZ DE LARA, M. J., SANCHEZ-NAVES, J. & PINTOR, J. 2017c. TRPV4 Stimulation Induced Melatonin Secretion by Increasing Arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) Protein Level. *Int J Mol Sci*, 18.
- ALKOZI, H. A. & PINTOR, J. 2015. TRPV4 activation triggers the release of melatonin from human non-pigmented ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res*, 136, 34-7.
- ALMASIEH, M., WILSON, A. M., MORQUETTE, B., CUEVA VARGAS, J. L. & DI POLO, A. 2012. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 31, 152-81.
- ALSBIK, P. H. 1976. Primary angle-closure glaucoma. Oculometry, epidemiology, and genetics in a high risk population. *Acta Ophthalmol Suppl*, 5-31.
- ANDERSON, M. G., LIBBY, R. T., MAO, M., COSMA, I. M., WILSON, L. A., SMITH, R. S. & JOHN, S. W. 2006. Genetic context determines susceptibility to intraocular pressure elevation in a mouse pigmentary glaucoma. *BMC Biol*, 4, 20.
- ANDERSON, M. G., SMITH, R. S., HAWES, N. L., ZABALETA, A., CHANG, B., WIGGS, J. L. & JOHN, S. W. 2002. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary

- glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet*, 30, 81-5.
- ANDRES-GUERRERO, V., MOLINA-MARTINEZ, I. T., PERAL, A., DE LAS HERAS, B., PINTOR, J. & HERRERO-VANRELL, R. 2011. The use of mucoadhesive polymers to enhance the hypotensive effect of a melatonin analogue, 5-MCA-NAT, in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 1507-15.
- ARENDT, J. 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod*, 3, 13-22.
- ARENDT, J., BOJKOWSKI, C., FRANEY, C., WRIGHT, J. & MARKS, V. 1985. Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulfate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24-hour rhythm with atenolol. *J Clin Endocrinol Metab*, 60, 1166-73.
- ARMALY, M. F., KRUEGER, D. E., MAUNDER, L., BECKER, B., HETHERINGTON, J., JR., KOLKER, A. E., LEVENE, R. Z., MAUMENEE, A. E., POLLACK, I. P. & SHAFFER, R. N. 1980. Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study. I. Summary report of the risk factors for glaucomatous visual-field defects. *Arch Ophthalmol*, 98, 2163-71.
- AUGUSTEYN, R. C., NANKIVIL, D., MOHAMED, A., MACEO, B., PIERRE, F. & PAREL, J. M. 2012. Human ocular biometry. *Exp Eye Res*, 102, 70-5.
- AXELROD, J. 1974. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*, 184, 1341-8.
- AYOUB, M. A., COUTURIER, C., LUCAS-MEUNIER, E., ANGERS, S., FOSSIER, P., BOUVIER, M. & JOCKERS, R. 2002. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 277, 21522-8.
- AYOUB, M. A., LEVOYE, A., DELAGRANGE, P. & JOCKERS, R. 2004. Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol*, 66, 312-21.
- BABA, K., BENLEULMI-CHAACHOUA, A., JOURNE, A. S., KAMAL, M., GUILLAUME, J. L., DUSSAUD, S., GBAHOU, F., YETTOU, K., LIU, C., CONTRERAS-ALCANTARA, S., JOCKERS, R. & TOSINI, G. 2013. Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci Signal*, 6, ra89.
- BABA, K., MAZZONI, F., OWINO, S., CONTRERAS-ALCANTARA, S., STRETTOI, E. & TOSINI, G. 2012. Age-related changes in the daily rhythm of photoreceptor functioning and circuitry in a melatonin-proficient mouse strain. *PLoS One*, 7, e37799.
- BAKER, J. G. 2005. The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors. *Br J Pharmacol*, 144, 317-22.
- BALIK, A., KRETSCHMANNOVA, K., MAZNA, P., SVOBODOVA, I. & ZEMKOVA, H. 2004. Melatonin action in neonatal gonadotrophs. *Physiol Res*, 53 Suppl 1, S153-66.
- BANGA, H. K., GUPTA, A. K. & SINGH, G. 2015. Volumetric and cost evaluation study of glaucoma medical therapy. *Int J Appl Basic Med Res*, 5, 96-9.
- BARDAK, H., UGUZ, A. C. & BARDAK, Y. 2017. Protective effects of melatonin and memantine in human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells against 2-ethylpyridine-induced oxidative stress: implications for age-related macular degeneration. *Cutan Ocul Toxicol*, 1-9.

- BARDAK, Y., OZERTURK, Y., OZGUNER, F., DURMUS, M. & DELIBAS, N. 2000. Effect of melatonin against oxidative stress in ultraviolet-B exposed rat lens. *Curr Eye Res*, 20, 225-30.
- BARNEBEY, H. & KWOK, S. Y. 2000. Patients' acceptance of a switch from dorzolamide to brinzolamide for the treatment of glaucoma in a clinical practice setting. *Clin Ther*, 22, 1204-12.
- BARRETT, P., IVANOVA, E., GRAHAM, E. S., ROSS, A. W., WILSON, D., PLE, H., MERCER, J. G., EBLING, F. J., SCHUHLER, S., DUPRE, S. M., LOUDON, A. & MORGAN, P. J. 2006. Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol*, 191, 687-98.
- BARTNESS, T. J. & GOLDMAN, B. D. 1989. Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia*, 45, 939-45.
- BECK-FRIIS, J., KJELLMAN, B. F., APERIA, B., UNDEN, F., VON ROSEN, D., LJUNGGREN, J. G. & WETTERBERG, L. 1985. Serum melatonin in relation to clinical variables in patients with major depressive disorder and a hypothesis of a low melatonin syndrome. *Acta Psychiatr Scand*, 71, 319-30.
- BELFORTE, N., MORENO, M. C., CYMERYNG, C., BORDONE, M., KELLER SARMIENTO, M. I. & ROSENSTEIN, R. E. 2007. Effect of ocular hypertension on retinal nitridergic pathway activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 2127-33.
- BELFORTE, N., SANDE, P., DE ZAVALIA, N., KNEPPER, P. A. & ROSENSTEIN, R. E. 2010. Effect of chondroitin sulfate on intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 5768-75.
- BENOZZI, J., NAHUM, L. P., CAMPANELLI, J. L. & ROSENSTEIN, R. E. 2002. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 2196-200.
- BERSON, D. M., DUNN, F. A. & TAKAO, M. 2002. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295, 1070-1073.
- BHATTACHARYYA, S., LUAN, J., CHALLIS, B., KEOGH, J., MONTAGUE, C., BRENNAND, J., MORTEN, J., LOWENBEIM, S., JENKINS, S., FAROOQI, I. S., WAREHAM, N. J. & O'RAHILLY, S. 2006. Sequence variants in the melatonin-related receptor gene (GPR50) associate with circulating triglyceride and HDL levels. *J Lipid Res*, 47, 761-6.
- BHOWMIK, D. K., K.; DEB, L.; PASWAN, S.; DUTTA, A.S. 2012. Glaucoma -A Eye Disorder Its Causes, Risk Factor, Prevention and Medication. *The Pharma Journal*, 1, 66-81.
- BITO, L. Z. 1987. Prostaglandins. Old concepts and new perspectives. *Arch Ophthalmol*, 105, 1036-9.
- BLOCK, E. R. & ROSTAND, R. A. 1978. Carbonic anhydrase inhibition in glaucoma: hazard or benefit for the chronic lunger? *Surv Ophthalmol*, 23, 169-72.
- BOJKOWSKI, C. J., ALDHOUS, M. E., ENGLISH, J., FRANNEY, C., POULTON, A. L., SKENE, D. J. & ARENDT, J. 1987. Suppression of nocturnal plasma melatonin and 6-sulphatoxymelatonin by bright and dim light in man. *Horm Metab Res*, 19, 437-40.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D., COLLIN, F., JORE, D. & GARDES-ALBERT, M. 2011. Reaction mechanism of melatonin oxidation by reactive

- oxygen species in vitro. *J Pineal Res*, 50, 328-35.
- BOURNE, R. R., TAYLOR, H. R., FLAXMAN, S. R., KEEFFE, J., LEASHER, J., NAIDOO, K., PESUDOV, K., WHITE, R. A., WONG, T. Y., RESNIKOFF, S. & JONAS, J. B. 2016. Number of People Blind or Visually Impaired by Glaucoma Worldwide and in World Regions 1990 - 2010: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 11, e0162229.
- BOUSSOMMIER-CALLEJA, A., BERTRAND, J., WOODWARD, D. F., ETHIER, C. R., STAMER, W. D. & OVERBY, D. R. 2012. Pharmacologic manipulation of conventional outflow facility in ex vivo mouse eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 5838-45.
- BOZKIR, G., BOZKIR, M., DOGAN, H., AYCAN, K. & GULER, B. 1997. Measurements of axial length and radius of corneal curvature in the rabbit eye. *Acta Med Okayama*, 51, 9-11.
- BRAINARD, G. C., HANIFIN, J. P., GREESON, J. M., BYRNE, B., GLICKMAN, G., GERNER, E. & ROLLAG, M. D. 2001. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci*, 21, 6405-12.
- BUBENIK, G. A., BROWN, G. M., UHLIR, I. & GROTA, L. J. 1974. Immunohistological localization of N-acetylindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Res*, 81, 233-42.
- BUFFA, A., RIZZI, E., FALCONI, M., MATTEUCCI, A., BARATTA, B., FANTAZZINI, A., LATTANZI, G. & RIZZOLI, R. 1993. Bromodeoxyuridine incorporation in corneal epithelium: an immunocytochemical study in rats. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 69, 767-73.
- BUNKER, S., HOLENIEWSKA, J., VIJAY, S., DAHLMANN-NOOR, A., KHAW, P., NG, Y. S., SHIMA, D. & FOXTON, R. 2015. Experimental glaucoma induced by ocular injection of magnetic microspheres. *J Vis Exp*.
- BUTLER, P., MANNSCHRECK, M., LIN, S., HWANG, I. & ALVARADO, J. 1995. Clinical experience with the long-term use of 1% apraclonidine. Incidence of allergic reactions. *Arch Ophthalmol*, 113, 293-6.
- CAHILL, G. M. & BESHARSE, J. C. 1992. Light-sensitive melatonin synthesis by *Xenopus* photoreceptors after destruction of the inner retina. *Vis Neurosci*, 8, 487-90.
- CANTOR, L. B. 1989. Systemic side effects of glaucoma medications. *Indiana Med*, 82, 105-7.
- CARDINALI, D. P. 1981. Melatonin. I A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev*, 2, 327-46.
- CARDINALI, D. P., GOLOMBEK, D. A., ROSENSTEIN, R. E., CUTRERA, R. A. & ESQUIFINO, A. I. 1997. Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? *J Pineal Res*, 23, 32-9.
- CARDINALI, D. P. & PEVET, P. 1998. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*, 2, 175-90.
- CARDINALI, D. P. & ROSNER, J. M. 1971. Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology*, 89, 301-3.
- CARRILLO-VICO, A., GARCIA-PERGANEDA, A., NAJI, L., CALVO, J. R., ROMERO, M. P. & GUERRERO, J. M. 2003. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci*, 60, 2272-8.
- CARRILLO-VICO, A., GUERRERO, J. M., LARDONE, P. J. & REITER, R. J. 2005. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 27, 189-200.

- CARTA, F., SUPURAN, C. T. & SCOZZAFAVA, A. 2012. Novel therapies for glaucoma: a patent review 2007 - 2011. *Expert Opin Ther Pat*, 22, 79-88.
- CAUMO, W., TORRES, F., MOREIRA, N. L., JR., AUZANI, J. A., MONTEIRO, C. A., LONDERO, G., RIBEIRO, D. F. & HIDALGO, M. P. 2007. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesth Analg*, 105, 1263-71, table of contents.
- CIVAN, M. M., BENOS, D. J. & SIMON, S. A. 2008. *The Eye's Aqueous Humor*, Elsevier Science.
- COAKES, R. L. & BRUBAKER, R. F. 1978. The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure. In the normal eye. *Arch Ophthalmol*, 96, 2045-8.
- COHEN, R. A. & ALBERS, H. E. 1991. Disruption of human circadian and cognitive regulation following a discrete hypothalamic lesion: a case study. *Neurology*, 41, 726-9.
- COLEMAN, A. L. & MIGLIOR, S. 2008. Risk factors for glaucoma onset and progression. *Surv Ophthalmol*, 53 Suppl1, S3-10.
- CONE, F. E., STEINHART, M. R., OGLESBY, E. N., KALESNYKAS, G., PEASE, M. E. & QUIGLEY, H. A. 2012. The effects of anesthesia, mouse strain and age on intraocular pressure and an improved murine model of experimental glaucoma. *Exp Eye Res*, 99, 27-35.
- CONWAY, S., CANNING, S. J., HOWELL, H. E., MOWAT, E. S., BARRETT, P., DREW, J. E., DELAGRANGE, P., LESIEUR, D. & MORGAN, P. J. 2000. Characterisation of human melatonin mt(1) and MT(2) receptors by CRE-luciferase reporter assay. *Eur J Pharmacol*, 390, 15-24.
- COSTA, V. P., HARRIS, A., STEFANSSON, E., FLAMMER, J., KRIEGLSTEIN, G. K., ORZALES, N., HEIJL, A., RENARD, J. P. & SERRA, L. M. 2003. The effects of antiglaucoma and systemic medications on ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res*, 22, 769-805.
- COURVILLE, C. B., SMOLEK, M. K. & KLYCE, S. D. 2004. Contribution of the ocular surface to visual optics. *Exp Eye Res*, 78, 417-25.
- CROOKE, A., GUZMAN-ARANGUEZ, A., MEDIERO, A., ALARMA-ESTRANY, P., CARRACEDO, G., PELAEZ, T., PERAL, A. & PINTOR, J. 2015. Effect of melatonin and analogues on corneal wound healing: involvement of Mt2 melatonin receptor. *Curr Eye Res*, 40, 56-65.
- CROOKE, A., HUETE-TORAL, F., MARTINEZ-AGUILA, A., ALARMA-ESTRANY, P. & PINTOR, J. 2011. Regulation of ocular adrenoceptor genes expression by 5-MCA-NAT: implications for glaucoma treatment. *Pharmacogenet Genomics*, 21, 587-9.
- CROOKE, A., HUETE-TORAL, F., MARTINEZ-AGUILA, A., MARTIN-GIL, A. & PINTOR, J. 2012. Involvement of carbonic anhydrases in the ocular hypotensive effect of melatonin analogue 5-MCA-NAT. *J Pineal Res*, 52, 265-70.
- CROOKE, A., HUETE-TORAL, F., MARTINEZ-AGUILA, A., MARTIN-GIL, A. & PINTOR, J. 2013. Melatonin and its analog 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine potentiate adrenergic receptor-mediated ocular hypotensive effects in rabbits: significance for combination therapy in glaucoma. *J Pharmacol Exp Ther*, 346, 138-45.
- CHEN, C. C., YEH, L. K., LIU, C. Y., KAO, W. W., SAMPLES, J. R., LIN, S. J., HU, F. R. & WANG, I. J. 2008. Morphological

- differences between the trabecular meshworks of zebrafish and mammals. *Curr Eye Res*, 33, 59-72.
- CHEN, J., RUNYAN, S. A. & ROBINSON, M. R. 2011. Novel ocular antihypertensive compounds in clinical trials. *Clin Ophthalmol*, 5, 667-77.
- CHIQUET, C., CLAUSTRAT, B., THURET, G., BRUN, J., COOPER, H. M. & DENIS, P. 2006. Melatonin concentrations in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*, 142, 325-327 e1.
- CHOU, T. H., KOCAOGLU, O. P., BORJA, D., RUGGERI, M., UHLHORN, S. R., MANNS, F. & PORCIATTI, V. 2011. Postnatal elongation of eye size in DBA/2J mice compared with C57BL/6J mice: in vivo analysis with whole-eye OCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 3604-12.
- CHUMBOATONG, W., THUMMAYOT, S., GOVITRAPONG, P., TOCHARUS, C., JITTIWAT, J. & TOCHARUS, J. 2017. Neuroprotection of agomelatine against cerebral ischemia/reperfusion injury through an antiapoptotic pathway in rat. *Neurochem Int*, 102, 114-122.
- DANIAS, J., KONTIOLA, A. I., FILIPPOPOULOS, T. & MITTAG, T. 2003. Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 1138-41.
- DAVIS, F. A. 1929. The Anatomy and Histology of the Eye and Orbit of the Rabbit. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 27, 400 2-441.
- DE BERARDIS, D., DI IORIO, G., ACCIAVATTI, T., CONTI, C., SERRONI, N., OLIVIERI, L., CAVUTO, M., MARTINOTTI, G., JANIRI, L., MOSCHETTA, F. S., CONTI, P. & DI GIANNANTONIO, M. 2011. The emerging role of melatonin agonists in the treatment of major depression: focus on agomelatine. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 10, 119-32.
- DE ZAVALIA, N., PLANO, S. A., FERNANDEZ, D. C., LANZANI, M. F., SALIDO, E., BELFORTE, N., SARMIENTO, M. I., GOLOMBEK, D. A. & ROSENSTEIN, R. E. 2011. Effect of experimental glaucoma on the non-image forming visual system. *J Neurochem*, 117, 904-14.
- DICKINSON, J. C., DURHAM, D. G. & HAMILTON, P. B. 1968. Ion exchange chromatography of free amino acids in aqueous fluid and lens of the human eye. *Invest Ophthalmol*, 7, 551-63.
- DÍEZ, J. E. B. & PUJOL, M. M. 2004. *Farmacología ocular*, Universitat Politècnica de Catalunya. Iniciativa Digital Politècnica.
- DO, C. W. & CIVAN, M. M. 2004. Basis of chloride transport in ciliary epithelium. *J Membr Biol*, 200, 1-13.
- DOUGHTY, M. J. & ZAMAN, M. L. 2000. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol*, 44, 367-408.
- DREW, J. E., BARRETT, P., WILLIAMS, L. M., CONWAY, S. & MORGAN, P. J. 1998. The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. *J Neuroendocrinol*, 10, 651-61.
- DUBOCOVICH, M. L. 1983. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*, 306, 782-4.
- DUBOCOVICH, M. L., DELAGRANGE, P., KRAUSE, D. N., SUGDEN, D., CARDINALI, D. P. & OLCESE, J. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*, 62, 343-80.

- DUBOCOVICH, M. L. & MARKOWSKA, M. 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27, 101-10.
- DUFOURNY, L., LEVASSEUR, A., MIGAUD, M., CALLEBAUT, I., PONTAROTTI, P., MALPAUX, B. & MONGET, P. 2008. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol*, 8, 105.
- DUNCAN, M. J., TAKAHASHI, J. S. & DUBOCOVICH, M. L. 1988. 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology*, 122, 1825-33.
- EBISAWA, T., KARNE, S., LERNER, M. R. & REPERT, S. M. 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6133-7.
- EDGAR, D. M., DEMENT, W. C. & FULLER, C. A. 1993. Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: evidence for opponent processes in sleep-wake regulation. *J Neurosci*, 13, 1065-79.
- EHONGO, A. & BREMER, F. 2007. [Ocular side effects of glaucoma treatment agents]. *Bull Soc Belge Ophthalmol*, 103-10.
- ER, H., TURKOZ, Y., MIZRAK, B. & PARLAKPINAR, H. 2006. Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy with protein kinase C inhibitor (chelerythrine chloride) and melatonin. *Ophthalmologica*, 220, 17-22.
- ERNEST, P. J., SCHOUTEN, J. S., BECKERS, H. J., HENDRIKSE, F., PRINS, M. H. & WEBERS, C. A. 2013. An evidence-based review of prognostic factors for glaucomatous visual field progression. *Ophthalmology*, 120, 512-9.
- FERRACIOLI-ODA, E., QAWASMI, A. & BLOCH, M. H. 2013. Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders. *PLoS One*, 8, e63773.
- FINGERET, M. 2001. Patient communication--the hidden procedure in the management of glaucoma. *Optometry*, 72, 279-81.
- FISCHER, T. W., SLOMINSKI, A., TOBIN, D. J. & PAUS, R. 2008. Melatonin and the hair follicle. *J Pineal Res*, 44, 1-15.
- FLUGEL, C., BARANY, E. H. & LUTJEN-DRECOLL, E. 1990. Histochemical differences within the ciliary muscle and its function in accommodation. *Exp Eye Res*, 50, 219-26.
- FONSECA, B., MARTINEZ-AGUILA, A., DE LARA, M. J. P. & PINTOR, J. 2017. Diadenosine tetraphosphate as a potential therapeutic nucleotide to treat glaucoma. *Purinergic Signal*, 13, 171-177.
- FORRESTER, J. V., DICK, A. D., MCMENAMIN, P. G., ROBERTS, F. & PEARLMAN, E. 2016. Chapter 1 - Anatomy of the eye and orbit. *The Eye (Fourth Edition)*. W.B. Saunders.
- FRANCIS, P. L., LEONE, A. M., YOUNG, I. M., STOVELL, P. & SILMAN, R. E. 1987. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydroxymelatonin glucuronide in urine. *Clin Chem*, 33, 453-7.
- FRANKFORT, B. J., KHAN, A. K., TSE, D. Y., CHUNG, I., PANG, J. J., YANG, Z., GROSS, R. L. & WU, S. M. 2013. Elevated intraocular pressure causes inner retinal dysfunction before cell loss in a mouse model of experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54, 762-70.
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. & SCHIOTH, H. B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main

- families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63, 1256-72.
- FU, C. T. & SRETAVAN, D. 2010. Laser-induced ocular hypertension in albino CD-1 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 980-90.
- FUJIEDA, H., HAMADANIZADEH, S. A., WANKIEWICZ, E., PANG, S. F. & BROWN, G. M. 1999. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience*, 93, 793-9.
- FUJIEDA, H., SCHER, J., HAMADANIZADEH, S. A., WANKIEWICZ, E., PANG, S. F. & BROWN, G. M. 2000. Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: immunocytochemical study of mt1 melatonin receptor in guinea pig retina. *Vis Neurosci*, 17, 63-70.
- FUKIAGE, C., MIZUTANI, K., KAWAMOTO, Y., AZUMA, M. & SHEARER, T. R. 2001. Involvement of phosphorylation of myosin phosphatase by ROCK in trabecular meshwork and ciliary muscle contraction. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 296-300.
- GABELT, B. T., KAUFMAN, P. L. & RASMUSSEN, C. A. 2011. Effect of nitric oxide compounds on monkey ciliary muscle in vitro. *Exp Eye Res*, 93, 321-7.
- GHARAGOZLOO, N. Z., RELF, S. J. & BRUBAKER, R. F. 1988. Aqueous flow is reduced by the alpha-adrenergic agonist, apraclonidine hydrochloride (ALO 2145). *Ophthalmology*, 95, 1217-20.
- GOES, R. M., BARBOSA, F. L., DE FARIA, E. S. S. J. & HADDAD, A. 2008. Morphological and autoradiographic studies on the corneal and limbal epithelium of rabbits. *Anat Rec (Hoboken)*, 291, 191-203.
- GOLDSMITH, C. S. & BELL-PEDERSEN, D. 2013. Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks. *Adv Genet*, 84, 1-39.
- GREAVES, D. P. & PERKINS, E. S. 1951. Aqueous veins in rabbits. *Br J Ophthalmol*, 35, 119-23.
- GRESSENS, P., SCHWENDIMANN, L., HUSSON, I., SARKOZY, G., MOCAER, E., VAMECQ, J. & SPEDDING, M. 2008. Agomelatine, a melatonin receptor agonist with 5-HT(2C) receptor antagonist properties, protects the developing murine white matter against excitotoxicity. *Eur J Pharmacol*, 588, 58-63.
- GRIESHABER, M. C. & FLAMMER, J. 2010. Is the medication used to achieve the target intraocular pressure in glaucoma therapy of relevance?--an exemplary analysis on the basis of two beta-blockers. *Prog Retin Eye Res*, 29, 79-93.
- GRUB, M. & ROHRBACH, J. M. 2006. [On the socio-economic relevance of glaucoma]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 223, 793-5.
- GUAL, A., MINTENIG, G. M. & BELMONTE, C. 1989. Intraocular pressure effects of water loading and venous compression tests in normal and denervated pigmented rabbits. *Exp Eye Res*, 48, 365-74.
- GUNES, A. & DAHL, M. L. 2008. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics*, 9, 625-37.
- GUZMAN-ARANGUEZ, A., SANTANO, C., MARTIN-GIL, A., FONSECA, B. & PINTOR, J. 2013. Nucleotides in the eye: focus on functional aspects and therapeutic perspectives. *J Pharmacol Exp Ther*, 345, 331-41.
- HAIMOV, I., LAUDON, M., ZISAPEL, N., SOUROUJON, M., NOF, D., SHLITNER, A., HERER, P.,

- TZISCHINSKY, O. & LAVIE, P. 1994. Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. *BMJ*, 309, 167.
- HANSEN, M. V., ANDERSEN, L. T., MADSEN, M. T., HAGEMAN, I., RASMUSSEN, L. S., BOKMAND, S., ROSENBERG, J. & GOGENUR, I. 2014. Effect of melatonin on depressive symptoms and anxiety in patients undergoing breast cancer surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Res Treat*, 145, 683-95.
- HARADA, T., HARADA, C., NAKAMURA, K., QUAH, H. M., OKUMURA, A., NAMEKATA, K., SAEKI, T., AIHARA, M., YOSHIDA, H., MITANI, A. & TANAKA, K. 2007. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest*, 117, 1763-70.
- HARDELAND, R., MADRID, J. A., TAN, D. X. & REITER, R. J. 2012. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*, 52, 139-66.
- HEINEMANN, S. H., STUHMER, W. & CONTI, F. 1987. Single acetylcholine receptor channel currents recorded at high hydrostatic pressures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 3229-33.
- HENRIKSSON, J. T., MCDERMOTT, A. M. & BERGMANSON, J. P. 2009. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 3648-54.
- HIRATA, F., HAYAISHI, O., TOKUYAMA, T. & SENO, S. 1974. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem*, 249, 1311-3.
- HOMMER, A., THYGESEN, J., FERRERAS, A., WICKSTROM, J., FRIIS, M. M., BUCHHOLZ, P. & WALT, J. G. 2008. A European perspective on costs and cost effectiveness of ophthalmic combinations in the treatment of open-angle glaucoma. *Eur J Ophthalmol*, 18, 778-86.
- HOWELL, G. R., LIBBY, R. T. & JOHN, S. W. 2008. Mouse genetic models: an ideal system for understanding glaucomatous neurodegeneration and neuroprotection. *Prog Brain Res*, 173, 303-21.
- HUETE-TORAL, F., CROOKE, A., MARTINEZ-AGUILA, A. & PINTOR, J. 2015. Melatonin receptors trigger cAMP production and inhibit chloride movements in nonpigmented ciliary epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 352, 119-28.
- HUGHES, S., HANKINS, M. W., FOSTER, R. G. & PEIRSON, S. N. 2012. Melanopsin phototransduction: slowly emerging from the dark. *Prog Brain Res*, 199, 19-40.
- IESTER, M., METE, M., FIGUS, M. & FREZZOTTI, P. 2009. Incorporating corneal pachymetry into the management of glaucoma. *J Cataract Refract Surg*, 35, 1623-8.
- IGUICHI, H., KATO, K. I. & IBAYASHI, H. 1982. Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 55, 27-9.
- ISMAIL, S. A. & MOWAFI, H. A. 2009. Melatonin provides anxiolysis, enhances analgesia, decreases intraocular pressure, and promotes better operating conditions during cataract surgery under topical anesthesia. *Anesth Analg*, 108, 1146-51.
- IVANOVA, E. A., BECHTOLD, D. A., DUPRE, S. M., BRENNAND, J., BARRETT, P., LUCKMAN, S. M. & LOUDON, A. S. 2008. Altered metabolism in the melatonin-

- related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E176-82.
- JAMPEL, H. D., ROBIN, A. L., QUIGLEY, H. A. & POLLACK, I. P. 1988. Apraclonidine. A one-week dose-response study. *Arch Ophthalmol*, 106, 1069-73.
- JARZYŃKA, M. J., PASSEY, D. K., JOHNSON, D. A., KONDURU, N. V., FITZ, N. F., RADIO, N. M., RASENICK, M., BENLOUCIF, S., MELAN, M. A. & WITTENDERBY, P. A. 2009. Microtubules modulate melatonin receptors involved in phase-shifting circadian activity rhythms: in vitro and in vivo evidence. *J Pineal Res*, 46, 161-71.
- JOCKERS, R., MAURICE, P., BOUTIN, J. A. & DELAGRANGE, P. 2008. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*, 154, 1182-95.
- JOHN, S. W., SMITH, R. S., SAVINOVA, O. V., HAWES, N. L., CHANG, B., TURNBULL, D., DAVISSON, M., RODERICK, T. H. & HECKENLIVELY, J. R. 1998. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 951-62.
- JOHNSON, E. C. & MORRISON, J. C. 2009. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J Glaucoma*, 18, 341-53.
- JOOS, K. M., LI, C. & SAPPINGTON, R. M. 2010. Morphometric changes in the rat optic nerve following short-term intermittent elevations in intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 6431-40.
- KAMAL, M., GBAHOU, F., GUILLAUME, J. L., DAULAT, A. M., BENLEULMI-CHAACHOUA, A., LUKA, M., CHEN, P., KALBASI ANARAKI, D., BARONCINI, M., MANNOURY LA COUR, C., MILLAN, M. J., PREVOT, V., DELAGRANGE, P. & JOCKERS, R. 2015. Convergence of melatonin and serotonin (5-HT) signaling at MT2/5-HT2C receptor heteromers. *J Biol Chem*, 290, 11537-46.
- KAMINSKI-HARTENTHALER, A., NUSSBAUMER, B., FORNERIS, C. A., MORGAN, L. C., GAYNES, B. N., SONIS, J. H., GREENBLATT, A., WIPPLINGER, J., LUX, L. J., WINKLER, D., VAN NOORD, M. G., HOFMANN, J. & GARTLEHNER, G. 2015. Melatonin and agomelatine for preventing seasonal affective disorder. *Cochrane Database Syst Rev*, CD011271.
- KHEZRI, M. B., OLADI, M. R. & ATLASBAF, A. 2013. Effect of melatonin and gabapentin on anxiety and pain associated with retrobulbar eye block for cataract surgery: a randomized double-blind study. *Indian J Pharmacol*, 45, 581-6.
- KILIC, E., HERMANN, D. M., ISENMANN, S. & BAHR, M. 2002. Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. *J Pineal Res*, 32, 106-11.
- KNUPP, C., PINALI, C., LEWIS, P. N., PARFITT, G. J., YOUNG, R. D., MEEK, K. M. & QUANTOCK, A. J. 2009. The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 78, 25-49.
- KONOWAL, A., MORRISON, J. C., BROWN, S. V., COOKE, D. L., MAGUIRE, L. J., VERDIER, D. V., FRAUNFELDER, F. T., DENNIS, R. F. & EPSTEIN, R. J. 1999. Irreversible corneal decompensation in patients treated with topical dorzolamide. *Am J Ophthalmol*, 127, 403-6.
- KOOK, M. S. & LEE, K. 2000. Increased eyelid pigmentation associated

- with use of latanoprost. *Am J Ophthalmol*, 129, 804-6.
- KRAUSE, U. & RAUNIO, V. 1969. Proteins of the normal human aqueous humour. *Ophthalmologica*, 159, 178-85.
- KRIPKE, D. F., ELLIOTT, J. A., WELSH, D. K. & YOUNGSTEDT, S. D. 2015. Photoperiodic and circadian bifurcation theories of depression and mania. *F1000Res*, 4, 107.
- KUMANOV, P., TOMOVA, A., ISIDORI, A. & NORDIO, M. 2005. Altered melatonin secretion in hypogonadal men: clinical evidence. *Int J Androl*, 28, 234-40.
- LA COUR, M. & EHINGER, B. 2005. The Retina. In: FISCHBARG, J. (ed.) *Advances in Organ Biology*. Elsevier.
- LANDERS, J., GOLDBERG, I. & GRAHAM, S. L. 2002. Analysis of risk factors that may be associated with progression from ocular hypertension to primary open angle glaucoma. *Clin Exp Ophthalmol*, 30, 242-7.
- LANGHAM, M. E. 1965. The response of the pupil and intraocular pressure of conscious rabbits to adrenergic drugs following unilateral superior cervical ganglionectomy. *Exp Eye Res*, 4, 381-9.
- LANGHAM, M. E. & TAYLOR, C. B. 1960. The influence of superior cervical ganglionectomy on intraocular dynamics. *J Physiol*, 152, 447-58.
- LARSSON, L. I., RETTIG, E. S., SHERIDAN, P. T. & BRUBAKER, R. F. 1993. Aqueous humor dynamics in low-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 116, 590-3.
- LASS, J. H., ERIKSSON, G. L., OSTERLING, L. & SIMPSON, C. V. 2001. Comparison of the corneal effects of latanoprost, fixed combination latanoprost-timolol, and timolol: A double-masked, randomized, one-year study. *Ophthalmology*, 108, 264-71.
- LE, A., MUKESH, B. N., MCCARTY, C. A. & TAYLOR, H. R. 2003. Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 3783-9.
- LEE, A. J. & GOLDBERG, I. 2011. Emerging drugs for ocular hypertension. *Expert Opin Emerg Drugs*, 16, 137-61.
- LEI, Y., OVERBY, D. R., BOUSSOMMIER-CALLEJA, A., STAMER, W. D. & ETHIER, C. R. 2011. Outflow physiology of the mouse eye: pressure dependence and washout. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 1865-71.
- LENER, A. B., CASE, J. D., TAKAHASHI, Y., LEE, T. H., MORI, W. 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2587.
- LEUNG, E. W., MEDEIROS, F. A. & WEINREB, R. N. 2008. Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients. *J Glaucoma*, 17, 350-5.
- LEVIN, L. A. & ADLER, F. H. 2011. *Adler's physiology of the eye* [Online].
- LEVOYE, A., DAM, J., AYOUB, M. A., GUILLAUME, J. L., COUTURIER, C., DELAGRANGE, P. & JOCKERS, R. 2006. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J*, 25, 3012-23.
- LEWIS, P. D., MIDDLETON, B. A. & GOUS, R. M. 2006. Exogenous melatonin modifies rate of sexual maturation in domestic pullets. *Poult Sci*, 85, 117-22.
- LEWY, A. J., WEHR, T. A., GOODWIN, F. K., NEWSOME, D. A. & MARKEY, S. P. 1980. Light suppresses melatonin secretion

- in humans. *Science*, 210, 1267-9.
- LI, D. Y., SMITH, D. G., HARDELAND, R., YANG, M. Y., XU, H. L., ZHANG, L., YIN, H. D. & ZHU, Q. 2013. Melatonin receptor genes in vertebrates. *Int J Mol Sci*, 14, 11208-23.
- LI, Y., SCHLAMP, C. L. & NICKELLS, R. W. 1999. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 1004-8.
- LIBBY, R. T., ANDERSON, M. G., PANG, I. H., ROBINSON, Z. H., SAVINOVA, O. V., COSMA, I. M., SNOW, A., WILSON, L. A., SMITH, R. S., CLARK, A. F. & JOHN, S. W. 2005. Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci*, 22, 637-48.
- LINDSEY, J. D. & WEINREB, R. N. 2002. Identification of the mouse uveoscleral outflow pathway using fluorescent dextran. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 2201-5.
- LIVELY, G. D., JIANG, B., HEDBERG-BUENZ, A., CHANG, B., PETERSEN, G. E., WANG, K., KUEHN, M. H. & ANDERSON, M. G. 2010. Genetic dependence of central corneal thickness among inbred strains of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 160-71.
- LORENZ, K., WOLFRAM, C., BREITSCHIEDL, L., SHLAEN, M., VERBOVEN, Y. & PFEIFFER, N. 2013. Direct cost and predictive factors for treatment in patients with ocular hypertension or early, moderate and advanced primary open-angle glaucoma: the CoGIS study in Germany. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 251, 2019-28.
- LUCHETTI, F., BETTI, M., CANONICO, B., ARCANGELETTI, M., FERRI, P., GALLI, F. & PAPA, S. 2009. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic Biol Med*, 46, 339-51.
- LUCHETTI, F., CANONICO, B., BETTI, M., ARCANGELETTI, M., PILOLLI, F., PIRODDI, M., CANESI, L., PAPA, S. & GALLI, F. 2010. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J*, 24, 3603-24.
- LUNTZ, M. H. 1966. Experimental glaucoma in the rabbit. *Am J Ophthalmol*, 61, 665-80.
- LUTJEN-DRECOLL, E., TAMM, E. & KAUFMAN, P. L. 1988. Age changes in rhesus monkey ciliary muscle: light and electron microscopy. *Exp Eye Res*, 47, 885-99.
- MACIAS, M., RODRIGUEZ-CABEZAS, M. N., REITER, R. J., OSUNA, A. & ACUNA-CASTROVIEJO, D. 1999. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res*, 27, 86-94.
- MANNI, G., LAMBIASE, A., CENTOFANTI, M., MATTEI, E., DE GREGORIO, A., ALOE, L. & DE FEO, G. 1996. Histopathological evaluation of retinal damage during intraocular hypertension in rabbit: involvement of ganglion cells and nerve fiber layer. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234 Suppl 1, S209-13.
- MARTIN, X. D., MALINA, H. Z., BRENNAN, M. C., HENDRICKSON, P. H. & LICHTER, P. R. 1992. The ciliary body--the third organ found to synthesize indoleamines in humans. *Eur J Ophthalmol*, 2, 67-72.
- MARTINEZ-AGUILA, A., FONSECA, B., BERGUA, A. & PINTOR, J. 2013. Melatonin analogue agomelatine reduces rabbit's intraocular pressure in normotensive and hypertensive conditions. *Eur J Pharmacol*, 701, 213-7.
- MARTINEZ-AGUILA, A., FONSECA, B., PEREZ DE LARA, M. J. & PINTOR, J. 2016. Effect of Melatonin and 5-

- Methoxycarbonylamino-N-Acetyltryptamine on the Intraocular Pressure of Normal and Glaucomatous Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 357, 293-9.
- MEDEIROS, F. A., SAMPLE, P. A., ZANGWILL, L. M., BOWD, C., AIHARA, M. & WEINREB, R. N. 2003. Corneal thickness as a risk factor for visual field loss in patients with preperimetric glaucomatous optic neuropathy. *Am J Ophthalmol*, 136, 805-13.
- MERMOUD, A., BAERVELDT, G., MICKLER, D. S., WU, G. S. & RAO, N. A. 1994. Animal model for uveitic glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 32, 553-60.
- MEYER, P., PACHE, M., LOEFFLER, K. U., BRYDON, L., JOCKERS, R., FLAMMER, J., WIRZ-JUSTICE, A. & SAVASKAN, E. 2002. Melatonin MT-1-receptor immunoreactivity in the human eye. *Br J Ophthalmol*, 86, 1053-7.
- MEYER, W. 1885. von Langenbeck's. *Archiv für klinische Chirurgie*, 31, 495-525.
- MILLAN, M. J., GOBERT, A., LEJEUNE, F., DEKEYNE, A., NEWMAN-TANCREDI, A., PASTEAU, V., RIVET, J. M. & CUSSAC, D. 2003. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 954-64.
- MOLINARI, E. J., NORTH, P. C. & DUBOCOVICH, M. L. 1996. 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur J Pharmacol*, 301, 159-68.
- MOORE, R. Y. 1992. The fourth C.U. Ariens Kappers lecture. The organization of the human circadian timing system. *Prog Brain Res*, 93, 99-115; discussion 115-7.
- MORENO, M. C., CAMPANELLI, J., SANDE, P., SANEZ, D. A., KELLER SARMIENTO, M. I. & ROSENSTEIN, R. E. 2004. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med*, 37, 803-12.
- MORENO, M. C., MARCOS, H. J., OSCAR CROXATTO, J., SANDE, P. H., CAMPANELLI, J., JALIFFA, C. O., BENOZZI, J. & ROSENSTEIN, R. E. 2005. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res*, 81, 71-80.
- MORGAN, J. E. & TRIBBLE, J. R. 2015. Microbead models in glaucoma. *Exp Eye Res*, 141, 9-14.
- MORRISON, J. C., MOORE, C. G., DEPPMEIER, L. M., GOLD, B. G., MESHUL, C. K. & JOHNSON, E. C. 1997. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res*, 64, 85-96.
- NATESAN, A. K. & CASSONE, V. M. 2002. Melatonin receptor mRNA localization and rhythmicity in the retina of the domestic chick, *Gallus domesticus*. *Vis Neurosci*, 19, 265-74.
- NIETGEN, G. W., SCHMIDT, J., HESSE, L., HONEMANN, C. W. & DURIEUX, M. E. 1999. Muscarinic receptor functioning and distribution in the eye: molecular basis and implications for clinical diagnosis and therapy. *Eye (Lond)*, 13 (Pt 3a), 285-300.
- NOECKER, R. J. 2006. The management of glaucoma and intraocular hypertension: current approaches and recent advances. *Ther Clin Risk Manag*, 2, 193-206.
- NOGUEIRA, R. C. & SAMPAIO, L. F. S. 2017. Eye and heart morphogenesis are dependent

- on the melatonin signaling in chick embryos. *J Exp Biol*.
- NOVACK, G. D., O'DONNELL, M. J. & MOLLOY, D. W. 2002. New glaucoma medications in the geriatric population: efficacy and safety. *J Am Geriatr Soc*, 50, 956-62.
- OSBORNE, N. N. 1994. Serotonin and melatonin in the iris/ciliary processes and their involvement in intraocular pressure. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 54 Suppl, 57-64.
- OSBORNE, N. N. & CHIDLOW, G. 1994. The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye. *Exp Eye Res*, 59, 3-9.
- OVERBY, D. R., BERTRAND, J., TEKTAS, O. Y., BOUSSOMMIER-CALLEJA, A., SCHICHT, M., ETHIER, C. R., WOODWARD, D. F., STAMER, W. D. & LUTJEN-DRECOLL, E. 2014. Ultrastructural changes associated with dexamethasone-induced ocular hypertension in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55, 4922-33.
- PANDI-PERUMAL, S. R., BAHAMMAM, A. S., OJIKE, N. I., AKINSEYE, O. A., KENDZERSKA, T., BUTTOO, K., DHANDAPANY, P. S., BROWN, G. M. & CARDINALI, D. P. 2016. Melatonin and Human Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*.
- PANDI-PERUMAL, S. R., TRAKHT, I., SRINIVASAN, V., SPENCE, D. W., MAESTRONI, G. J., ZISAPEL, N. & CARDINALI, D. P. 2008. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*, 85, 335-53.
- PANG, S. F., YU, H. S., SUEN, H. C. & BROWN, G. M. 1980. Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol*, 87, 89-93.
- PARDRIDGE, W. M. & MIETUS, L. J. 1980. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 34, 1761-3.
- PARRISH, R. K., PALMBERG, P. & SHEU, W. P. 2003. A comparison of latanoprost, bimatoprost, and travoprost in patients with elevated intraocular pressure: a 12-week, randomized, masked-evaluator multicenter study. *Am J Ophthalmol*, 135, 688-703.
- PATTABIRAMAN, P. P., LIH, F. B., TOMER, K. B. & RAO, P. V. 2012. The role of calcium-independent phospholipase A2gamma in modulation of aqueous humor drainage and Ca²⁺ sensitization of trabecular meshwork contraction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302, C979-91.
- PEREZ DE LARA, M. J., SANTANO, C., GUZMAN-ARANGUEZ, A., VALIENTE-SORIANO, F. J., AVILES-TRIGUEROS, M., VIDAL-SANZ, M., DE LA VILLA, P. & PINTOR, J. 2014. Assessment of inner retina dysfunction and progressive ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res*, 122, 40-9.
- PESCOSOLIDO, N., GATTO, V., STEFANUCCI, A. & RUSCIANO, D. 2015. Oral treatment with the melatonin agonist agomelatine lowers the intraocular pressure of glaucoma patients. *Ophthalmic Physiol Opt*, 35, 201-5.
- PICINATO, M. C., HIRATA, A. E., CIPOLLA-NETO, J., CURI, R., CARVALHO, C. R., ANHE, G. F. & CARPINELLI, A. R. 2008. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *J Pineal Res*, 44, 88-94.
- PIERCE, M. E. & BESHARSE, J. C. 1985. Circadian regulation of retinomotor movements. I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone

- length. *J Gen Physiol*, 86, 671-89.
- PINTOR, J. 2009. *Autonomic Nervous System: Ophthalmic Control*, Oxford, Academic Press.
- PINTOR, J., MARTIN, L., PELAEZ, T., HOYLE, C. H. & PERAL, A. 2001. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol*, 416, 251-4.
- PINTOR, J., PELAEZ, T., HOYLE, C. H. & PERAL, A. 2003. Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor. *Br J Pharmacol*, 138, 831-6.
- PINTOR, J. J., CARRACEDO, G., MEDIERO, A., GUZMAN-ARANGUEZ, A., IRAZU, M., PELAEZ, T. & PERAL, A. 2005. Melatonin Increases the Rate of Corneal Re-epithelialisation in New Zealand White Rabbits. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, A2152.
- POEGGELER, B. & HARDELAND, R. 1994. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J Pineal Res*, 17, 1-10.
- PRINGLE, A., BOGDANOVSKAYA, M., WASKETT, P., ZACHARIA, S., COWEN, P. J. & HARMER, C. J. 2015. Does melatonin treatment change emotional processing? Implications for understanding the antidepressant mechanism of agomelatine. *J Psychopharmacol*, 29, 1129-32.
- PULIDO, O. & CLIFFORD, J. 1986. Age-associated changes in the circadian rhythm of retinal N-acetylserotonin and melatonin in rats with pigmented eyes. *Exp Gerontol*, 21, 23-30.
- QUERA SALVA, M. A., HARTLEY, S., BARBOT, F., ALVAREZ, J. C., LOFASO, F. & GUILLEMINAULT, C. 2011. Circadian rhythms, melatonin and depression. *Curr Pharm Des*, 17, 1459-70.
- QUIGLEY, H. A. 2011. Glaucoma. *Lancet*, 377, 1367-77.
- RADA, J. A. & WIECHMANN, A. F. 2006. Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 25-33.
- RAMOS, E., PATINO, P., REITER, R. J., GIL-MARTIN, E., MARCO-CONTELLAS, J., PARADA, E., LOS RIOS, C., ROMERO, A. & EGEEA, J. 2017. Ischemic brain injury: New insights on the protective role of melatonin. *Free Radic Biol Med*, 104, 32-53.
- RAO, P. V., DENG, P. F., KUMAR, J. & EPSTEIN, D. L. 2001. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1029-37.
- RAO, V. P. & EPSTEIN, D. L. 2007. Rho GTPase/Rho kinase inhibition as a novel target for the treatment of glaucoma. *BioDrugs*, 21, 167-77.
- RAZALI, N., AGARWAL, R., AGARWAL, P., KAPITONOVA, M. Y., KANNAN KUTTY, M., SMIRNOV, A., SALMAH BAKAR, N. & ISMAIL, N. M. 2015. Anterior and posterior segment changes in rat eyes with chronic steroid administration and their responsiveness to antiglaucoma drugs. *Eur J Pharmacol*, 749, 73-80.
- REDDY, V. N., GIBLIN, F. J., LIN, L. R. & CHAKRAPANI, B. 1998. The effect of aqueous humor ascorbate on ultraviolet-B-induced DNA damage in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 344-50.
- REITER, R. J. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*, 12, 151-80.
- REITER, R. J., PAREDES, S. D., MANCHESTER, L. C. & TAN, D. X. 2009. Reducing

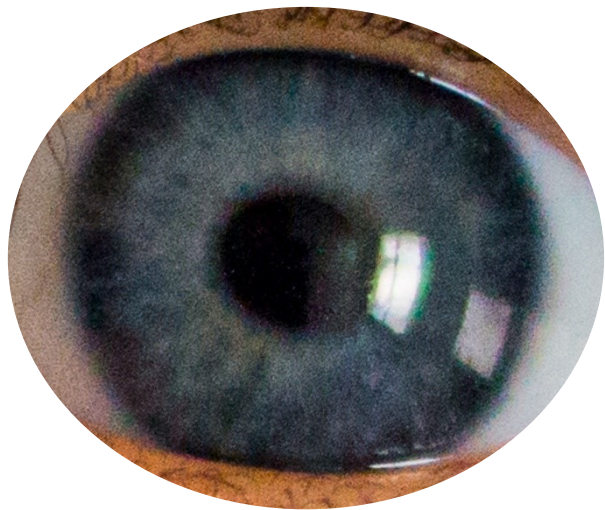
- oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 44, 175-200.
- REMINGTON, L. A. 2012. Chapter 1 - Visual System. *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition)*. Saint Louis: Butterworth-Heinemann.
- RENIERI, G., CHORITZ, L., ROSENTHAL, R., MEISSNER, S., PFEIFFER, N. & THIEME, H. 2008. Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular meshwork. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246, 1107-15.
- REPPERT, S. M., GODSON, C., MAHLE, C. D., WEAVER, D. R., SLAUGENHAUPT, S. A. & GUSELLA, J. F. 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8734-8.
- REPPERT, S. M., WEAVER, D. R., EBISAWA, T., MAHLE, C. D. & KOLAKOWSKI, L. F., JR. 1996. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett*, 386, 219-24.
- REYES, P. F., DWYER, B. A., SCHWARTZMAN, R. J. & SACCHETTI, T. 1987. Mental status changes induced by eye drops in dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 50, 113-5.
- RIAU, A. K., TAN, N. Y., ANGUNAWELA, R. I., HTOON, H. M., CHAURASIA, S. S. & MEHTA, J. S. 2012. Reproducibility and age-related changes of ocular parametric measurements in rabbits. *BMC Vet Res*, 8, 138.
- ROBERTS, J. E., WIECHMANN, A. F. & HU, D. N. 2000. Melatonin receptors in human uveal melanocytes and melanoma cells. *J Pineal Res*, 28, 165-71.
- ROCA, A. L., GODSON, C., WEAVER, D. R. & REPPERT, S. M. 1996. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology*, 137, 3469-77.
- RODRIGUEZ, C., MAYO, J. C., SAINZ, R. M., ANTOLIN, I., HERRERA, F., MARTIN, V. & REITER, R. J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 36, 1-9.
- ROSEN, R., HU, D. N., PEREZ, V., TAI, K., YU, G. P., CHEN, M., TONE, P., MCCORMICK, S. A. & WALSH, J. 2009. Urinary 6-sulfatoxymelatonin level in age-related macular degeneration patients. *Mol Vis*, 15, 1673-9.
- ROSENTHAL, R., CHORITZ, L., SCHLOTT, S., BECHRAKIS, N. E., JAROSZEWSKI, J., WIEDERHOLT, M. & THIEME, H. 2005. Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol- and endothelin-1-induced contraction of bovine trabecular meshwork. *Exp Eye Res*, 80, 837-45.
- ROWLAND, J. M., POTTER, D. E. & REITER, R. J. 1981. Circadian rhythm in intraocular pressure: a rabbit model. *Curr Eye Res*, 1, 169-73.
- ROY CHOWDHURY, U., HANN, C. R., STAMER, W. D. & FAUTSCH, M. P. 2015. Aqueous humor outflow: dynamics and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56, 2993-3003.
- RUFER, F., SCHRODER, A. & ERB, C. 2005. White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea*, 24, 259-61.
- SAMPAIO LDE, F. 2008. Melatonin inhibitory effect on cAMP accumulation in the chick retina development. *Int J Dev Neurosci*, 26, 277-82.
- SAMPAIO LDE, F. 2009. An unexpected effect of 5-MCA-NAT in chick retinal development. *Int J Dev Neurosci*, 27, 511-5.
- SAMPLES, J. R., KRAUSE, G. & LEWY, A. J. 1988. Effect of melatonin on

- intraocular pressure. *Curr Eye Res*, 7, 649-53.
- SAMSEL, P. A., KISISWA, L., ERICHSEN, J. T., CROSS, S. D. & MORGAN, J. E. 2011. A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 1671-5.
- SAPPINGTON, R. M., CARLSON, B. J., CRISH, S. D. & CALKINS, D. J. 2010. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 207-16.
- SAVASKAN, E., JOCKERS, R., AYOUB, M., ANGELONI, D., FRASCHINI, F., FLAMMER, J., ECKERT, A., MULLER-SPAHN, F. & MEYER, P. 2007. The MT2 melatonin receptor subtype is present in human retina and decreases in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 4, 47-51.
- SAVASKAN, E., WIRZ-JUSTICE, A., OLIVIERI, G., PACHE, M., KRAUCHI, K., BRYDON, L., JOCKERS, R., MULLER-SPAHN, F. & MEYER, P. 2002. Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. *J Histochem Cytochem*, 50, 519-26.
- SAWADA, A. & NEUFELD, A. H. 1999. Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res*, 69, 525-31.
- SCHER, J., WANKIEWICZ, E., BROWN, G. M. & FUJIEDA, H. 2002. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 889-97.
- SCHERER, W. J. 2002. A retrospective review of non-responders to latanoprost. *J Ocul Pharmacol Ther*, 18, 287-91.
- SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N., HELLNER, N., MIDDENDORF, R., MULLER, D. & OLCESE, J. 2003. The human myometrium as a target for melatonin. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 908-13.
- SCHULZ, D., ILIEV, M. E., FRUEH, B. E. & GOLDBLUM, D. 2003. In vivo pachymetry in normal eyes of rats, mice and rabbits with the optical low coherence reflectometer. *Vision Res*, 43, 723-8.
- SEEFELDT, M. B., CROUCH, C., KENDRICK, B. & RANDOLPH, T. W. 2007. Specific volume and adiabatic compressibility measurements of native and aggregated recombinant human interleukin-1 receptor antagonist: density differences enable pressure-modulated refolding. *Biotechnol Bioeng*, 98, 476-85.
- SELBACH, J. M., GOTTANKA, J., WITTMANN, M. & LUTJEN-DRECOLL, E. 2000. Efferent and afferent innervation of primate trabecular meshwork and scleral spur. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 2184-91.
- SERLE, J. B., WANG, R. F., PETERSON, W. M., PLOURDE, R. & YERXA, B. R. 2004. Effect of 5-MCA-NAT, a putative melatonin MT3 receptor agonist, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes. *J Glaucoma*, 13, 385-8.
- SEWERYNEK, E. 2002. Melatonin and the cardiovascular system. *Neuro Endocrinol Lett*, 23 Suppl 1, 79-83.
- SHAREEF, S., SAWADA, A. & NEUFELD, A. H. 1999. Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 2884-91.
- SHAREEF, S. R., GARCIA-VALENZUELA, E., SALIERNO, A., WALSH, J. & SHARMA, S. C. 1995. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res*, 61, 379-82.
- SIEBENALLER, J. F. 2003. Pressure effects on the GTPase activity of brain membrane G proteins of

- deep-living marine fishes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 135, 697-705.
- SLOMINSKI, A., FISCHER, T. W., ZMIJEWSKI, M. A., WORTSMAN, J., SEMAK, I., ZBYTEK, B., SLOMINSKI, R. M. & TOBIN, D. J. 2005. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine*, 27, 137-48.
- SLOMINSKI, A., TOBIN, D. J., ZMIJEWSKI, M. A., WORTSMAN, J. & PAUS, R. 2008. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*, 19, 17-24.
- SOMMER, A. & TIELSCH, J. M. 1996. Risk factors for open-angle glaucoma: the Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol*, 114, 235.
- SRINIVASAN, V., CARDINALI, D. P., SRINIVASAN, U. S., KAUR, C., BROWN, G. M., SPENCE, D. W., HARDELAND, R. & PANDIPERUMAL, S. R. 2011. Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection. *Ther Adv Neurol Disord*, 4, 297-317.
- STAMER, W. D., LEI, Y., BOUSSOMMIER-CALLEJA, A., OVERBY, D. R. & ETHIER, C. R. 2011. eNOS, a pressure-dependent regulator of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 9438-44.
- STEFULJ, J., HORTNER, M., GHOSH, M., SCHAUENSTEIN, K., RINNER, I., WOLFLER, A., SEMMLER, J. & LIEBMANN, P. M. 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*, 30, 243-7.
- STOKES, G. S. & WEBER, M. A. 1974. Prazosin: preliminary report and comparative studies with other antihypertensive agents. *Br Med J*, 2, 298-300.
- SUDESH, S., COHEN, E. J., RAPUANO, C. J. & WILSON, R. P. 1999. Corneal toxicity associated with latanoprost. *Arch Ophthalmol*, 117, 539-40.
- TALLUTO, D. M., WYSE, T. B. & KRUPIN, T. 1997. Topical carbonic anhydrase inhibitors. *Curr Opin Ophthalmol*, 8, 2-6.
- TAMM, E. R., CARASSA, R. G., ALBERT, D. M., GABELT, B. T., PATEL, S., RASMUSSEN, C. A. & KAUFMAN, P. L. 2004. Viscocanalostomy in rhesus monkeys. *Arch Ophthalmol*, 122, 1826-38.
- TAN, D. X., CHEN, L. D., POEGGELER, B., MANCHESTER, L. C., REITER, R. J. 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal*.
- TAYLOR, A., JACQUES, P. F., NADLER, D., MORROW, F., SULSKY, S. I. & SHEPARD, D. 1991. Relationship in humans between ascorbic acid consumption and levels of total and reduced ascorbic acid in lens, aqueous humor, and plasma. *Curr Eye Res*, 10, 751-9.
- THAPAN, K., ARENDT, J. & SKENE, D. J. 2001. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol*, 535, 261-7.
- THIEME, H., NUSKOVSKI, M., NASS, J. U., PLEYER, U., STRAUSS, O. & WIEDERHOLT, M. 2000. Mediation of calcium-independent contraction in trabecular meshwork through protein kinase C and rho-A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 4240-6.
- THOMSON, P. A., WRAY, N. R., THOMSON, A. M., DUNBAR, D. R., GRASSIE, M. A., CONDIE, A., WALKER, M. T., SMITH, D. J., PULFORD, D. J., MUIR, W., BLACKWOOD, D. H. & PORTEOUS, D. J. 2005. Sex-specific association between

- bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Mol Psychiatry*, 10, 470-8.
- TOMAS-ZAPICO, C., ALVAREZ-GARCIA, O., SIERRA, V., VEGA-NAREDO, I., CABALLERO, B., JOAQUIN GARCIA, J., ACUNA-CASTROVIEJO, D., RODRIGUEZ, M. I., TOLIVIA, D., RODRIGUEZ-COLUNGA, M. J. & COTO-MONTES, A. 2006. Oxidative damage in the livers of senescence-accelerated mice: a gender-related response. *Can J Physiol Pharmacol*, 84, 213-20.
- TORIS, C. B., GLEASON, M. L., CAMRAS, C. B. & YABLONSKI, M. E. 1995a. Effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Arch Ophthalmol*, 113, 1514-7.
- TORIS, C. B., TAFOYA, M. E., CAMRAS, C. B. & YABLONSKI, M. E. 1995b. Effects of apraclonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmology*, 102, 456-61.
- TORNGREN, L., LUNDGREN, B. & MADSEN, K. 2000. Intraocular pressure development in the rabbit eye after aqueous exchange with ophthalmic viscosurgical devices. *J Cataract Refract Surg*, 26, 1247-52.
- TOSINI, G., CHAURASIA, S. S. & MICHAEL IUVONE, P. 2006. Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) in the retina. *Chronobiol Int*, 23, 381-91.
- TOSINI, G., IUVONE, M. & BOATRIGHT, J. H. 2013. Is the melatonin receptor type 1 involved in the pathogenesis of glaucoma? *J Glaucoma*, 22 Suppl 5, S49-50.
- TRIVIÑO CASADO, A., RAMÍREZ SEBASTIÁN, J.M., GARCÍA SANCHEZ, J. 1984. Primeras aportaciones sobre modificaciones vasculares en el disco óptico del conejo tras la provocación del glaucoma experimental con alfa-quimiotripsina. *Arch soc esp oftalmol*, 46, 427-432.
- URCOLA, J. H., HERNANDEZ, M. & VECINO, E. 2006. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res*, 83, 429-37.
- VIDAL-SANZ, M., BRAY, G. M. & AGUAYO, A. J. 1991. Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol*, 20, 940-52.
- VIDAL-SANZ, M., BRAY, G. M., VILLEGAS-PEREZ, M. P., THANOS, S. & AGUAYO, A. J. 1987. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci*, 7, 2894-909.
- VIGH, B. & VIGH-TEICHMANN, I. 1981. Light- and electron-microscopic demonstration of immunoreactive opsin in the pinealocytes of various vertebrates. *Cell Tissue Res*, 221, 451-63.
- VINCENT, L., COHEN, W., DELAGRANGE, P., BOUTIN, J. A. & NOSJEAN, O. 2010. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. *J Pineal Res*, 48, 222-9.
- WAND, M., GILBERT, C. M. & LIESEGANG, T. J. 1999. Latanoprost and herpes simplex keratitis. *Am J Ophthalmol*, 127, 602-4.
- WANG, W. H., MILLAR, J. C., PANG, I. H., WAX, M. B. & CLARK, A. F. 2005. Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 4617-21.
- WEBER, A. J. & ZELENAK, D. 2001. Experimental glaucoma in the

- primate induced by latex microspheres. *J Neurosci Methods*, 111, 39-48.
- WEBERS, C. A., BECKERS, H. J., NUIJTS, R. M. & SCHOUTEN, J. S. 2008. Pharmacological management of primary open-angle glaucoma: second-line options and beyond. *Drugs Aging*, 25, 729-59.
- WEBSTER, A. R., LUFF, A. J., CANNING, C. R. & ELKINGTON, A. R. 1993. The effect of pilocarpine on the glaucomatous visual field. *Br J Ophthalmol*, 77, 721-5.
- WEINREB, R. N., TORIS, C. B., GABELT, B. T., LINDSEY, J. D. & KAUFMAN, P. L. 2002. Effects of prostaglandins on the aqueous humor outflow pathways. *Surv Ophthalmol*, 47 Suppl 1, S53-64.
- WHITE, M. P. & FISHER, L. J. 1989. Effects of exogenous melatonin on circadian disc shedding in the albino rat retina. *Vision Res*, 29, 167-79.
- WIECHMANN, A. F. 1986. Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Exp Eye Res*, 42, 507-27.
- WIECHMANN, A. F. & RADA, J. A. 2003. Melatonin receptor expression in the cornea and sclera. *Exp Eye Res*, 77, 219-25.
- WIECHMANN, A. F. & SHERRY, D. M. 2012. Melatonin receptors are anatomically organized to modulate transmission specifically to cone pathways in the retina of *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol*, 520, 1115-27.
- WIECHMANN, A. F. & SMITH, A. R. 2001. Melatonin receptor RNA is expressed in photoreceptors and displays a diurnal rhythm in *Xenopus* retina. *Brain Res Mol Brain Res*, 91, 104-11.
- WIECHMANN, A. F. & SUMMERS, J. A. 2008. Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. *Prog Retin Eye Res*, 27, 137-60.
- WIECHMANN, A. F., UDIN, S. B. & SUMMERS RADA, J. A. 2004. Localization of Mel1b melatonin receptor-like immunoreactivity in ocular tissues of *Xenopus laevis*. *Exp Eye Res*, 79, 585-94.
- WIECHMANN, A. F., YANG, X. L., WU, S. M. & HOLLYFIELD, J. G. 1988. Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Res*, 453, 377-80.
- WONGPRAYOON, P. & GOVITRAPONG, P. 2017. Melatonin as a mitochondrial protector in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci*.
- YI, C., PAN, X., YAN, H., GUO, M. & PIERPAOLI, W. 2005. Effects of melatonin in age-related macular degeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 1057, 384-92.
- YOUSAF, F., SEET, E., VENKATRAGHAVAN, L., ABRISHAMI, A. & CHUNG, F. 2010. Efficacy and safety of melatonin as an anxiolytic and analgesic in the perioperative period: a qualitative systematic review of randomized trials. *Anesthesiology*, 113, 968-76.
- ZHANG, E. P., SCHRUNDER, S. & HOFFMANN, F. 1996. Orthotopic corneal transplantation in the mouse--a new surgical technique with minimal endothelial cell loss. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234, 714-9.
- ZHOU, X., LI, F., KONG, L., TOMITA, H., LI, C. & CAO, W. 2005. Involvement of inflammation, degradation, and apoptosis in a mouse model of glaucoma. *J Biol Chem*, 280, 31240-8.



ANEXOS

VIII. ANEXO

ARTÍCULOS PUBLICADOS (13)

- BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; MARIA TERESA MIRAS PORTUGAL; MARIA ROSA GOMEZ VILLAFUERTE; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Changes in P2Y purinergic receptor expression in the ciliary body in a murine model of glaucoma. *Frontiers in Pharmacology*. 26/09/2017.
- BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Diadenosine tetraphosphate as a potential therapeutic nucleotide to treat glaucoma.;. *Purinergic Signalling*. 2, pp. 171 - 177. (Alemania): 01/06/2017. ISSN 1573-9538
- HANAN AWAD ALCOZI; JUAN SÁNCHEZ NAVES; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Elevated intraocular pressure increases melatonin levels in the aqueous humour. *Acta Ophthalmologica*. (Dinamarca): 01/09/2016. ISSN 0001-639X
- ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Effect of Melatonin and 5-MCA-NAT on the IOP on normal and glaucomatous mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (Estados Unidos de América): 03/03/2016. ISSN 0022-3565
- ANA ISABEL GUZMAN ARANGUEZ; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; ALBA MARTIN GIL; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.

Dry Eye Treatment Based on Contact Lens Drug Delivery: A Review. Eye Contact Lens. (Estados Unidos de América): 14/09/2015. ISSN 1542-2321

- FERNANDO HUETE TORAL; ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Melatonin receptors trigger cAMP production and inhibit chloride movements in non-pigmented ciliary epithelial cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1, pp. 119 - 128. (Estados Unidos de América): 01/01/2015. ISSN 0022-3565 Tipo de producción: Artículo
- BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; MIGUEL DIAZ HERNANDEZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Diadenosine tetraphosphate contributes to carbachol-induced tear secretion. Purinergic Signalling. (Alemania): 15/11/2014. ISSN 1573-9538
- ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; FELIX HERNANDEZ; MIGUEL DIAZ HERNANDEZ; JESUS AVILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Tau Triggers Tear Secretion by Interacting with Muscarinic Acetylcholine Receptors in New Zealand White Rabbits. Journal of Alzheimer's Disease. 1, pp. 71 - 77. (Holanda): 06/02/2014. ISSN 1387-2877
- ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; FERNANDO HUETE; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ALBA MARTIN GIL; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Melatonin and its analogue 5-MCA-NAT potentiate adrenergic receptor-mediated ocular hypotensive effects in rabbits: Significance for combination therapy in glaucoma. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 3, pp. 213 - 217. (Estados Unidos de América): 10/07/2013. ISSN 0022-3565

- ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ANTONIO BERGUA AZNAR; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Melatonin analogue agomelatine reduces rabbit's intraocular pressure in normotensive and hypertensive conditions. European Journal of Pharmacology. 1-3, pp. 213 - 217. (Holanda): 15/02/2013. ISSN 0014-2999
- ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; FERNANDO HUETE TORAL; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BASILIO COLLIGRIS; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Ocular disorders and the utility of animal models in the discovery of melatoninerigic drugs with therapeutic potential. Expert Opinion on Drug Discovery. 10, pp. 989 - 1001. (Reino Unido): 07/10/2012. ISSN 1746-0441
- ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; FERNANDO HUETE TORAL; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ALBA MARTIN GIL; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Involvement of carbonic anhydrases in the ocular hypotensive effect of melatonin analogue. Journal of Pineal Research. 3, pp. 265 - 270. (Reino Unido): 01/04/2012. ISSN 0742-3098
- ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; FERNANDO HUETE TORAL; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; PILAR ALARMA ESTRANY; JESUS JERONIMO PINTOR JUST. Regulation of ocular adrenoceptor genes expression by 5-MCA-NAT: implications for glaucoma treatment. Pharmacogenetics and Genomics. 9, pp. 587 - 589. (Estados Unidos de América): 01/09/2011. ISSN 1744-6872

COMUNICACIONES Y CONTRIBUCIONES A CONGRESOS (29)

- Título del trabajo: FULL SCLERAL CONTACT LENS FITTING IN UNILATERAL KERATOCONUS Nombre del congreso: EAOO 2017 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 12/05/2017 Ciudad entidad organizadora: BARCELONA, España ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; Anahi González Bergaz; IRENE LOZANO SIERRA; JESUS CARBALLO ALVAREZ.
- Título del trabajo: Long-Effect of 5-MCA-NAT on the IOP of glaucomatous mice; Nombre del congreso: EAOO 2017 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 12/05/2017 Ciudad entidad organizadora: BARCELONA, España ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; MARIA ROSA GOMEZ VILLAFUERTES; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Trendelenburg position: a simple method to test glaucomatous hypotensive compounds in a hypertensive condition; Nombre del congreso: CIOCV 2017 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 22/04/2017 Ciudad entidad organizadora: Portugal ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; Anahi González Bergaz; ALBA MARTIN GIL; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Effect on tear secretion of dinucleotides and melatonin analogues in combined therapy.; Nombre del congreso: CIOCV 2017 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de

participación: Póster Ciudad de celebración: BRAGA, Portugal Fecha de celebración: 22/04/2017 Ciudad entidad organizadora: Portugal Anahi González Bergaz; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.

- Título del trabajo: Ap4a in combined therapy with alphagan® and timoftol® in a glaucoma model Nombre del congreso: CIOCV 2017 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: BRAGA, Portugal Fecha de celebración: 22/04/2017 Ciudad entidad organizadora: Portugal BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ALBA MARTIN GIL; Anahi González Bergaz; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Melatonin levels in the aqueous humour: connection with intraocular pressure; Nombre del congreso: CIOCV 2017 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: BRAGA, Portugal Fecha de celebración: 22/04/2017 Ciudad entidad organizadora: Portugal Hanan Awad Alkozy; Juan Sanchez Naves; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST
- Título del trabajo: The Effect of Preserved Antiglaucoma Eye-drops on Goblet Cells and the Expression of Pro-inflammatory Markers. Nombre del congreso: ARVO 2016 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Seattle, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 01/05/2016 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América Javier Moreno Montañes; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; E Carnero; A

Bleau; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST; A Guarnieri.

- Título del trabajo: Elevated intraocular pressure increases melatonin levels in the aqueous humour Nombre del congreso: ARVO 2016 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: SEATTLE WA, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 01/05/2016 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América JESUS JERONIMO PINTOR JUST; HANAN AWAD ALCOZI; J Sanchez-Naves; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA.
- Título del trabajo: Effect of diguanine polyphosphates on tear secretion Nombre del congreso: CIOCV 16 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 23/04/2016 Ciudad entidad organizadora: Portugal Adriana Gascó Sanchez; Ana Pinar Rincón; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ
- Título del trabajo: Effect of melatonin analogues on tear secretion Nombre del congreso: CIOCV 16 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 23/04/2016 Ciudad entidad organizadora: Portugal ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ.
- Título del trabajo: Evaluation of the protective effect of an artificial tear drops with Aloe Vera in corneal epithelium cells compared to other

artificial tear drops Nombre del congreso: CIOCV 16 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 23/04/2016 Ciudad entidad organizadora: Portugal BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALBA MARTIN GIL; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.

- Título del trabajo: TEMPERATURA DE LA SUPERFICIE OCULAR EN PACIENTES CON SINDROME DE SJÖGREN Nombre del congreso: Optom 2016 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Nacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 08/04/2016 Ciudad entidad organizadora: MADRID, España ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; Candela Rodriguez Pomar; Amaia Martín Hermoso; ALBA MARTIN GIL; JESUS JERONIMO PINTOR JUST; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ.
- Título del trabajo: Efecto de la ortoqueratología sobre signos y síntomas de ojo seco: Comparación entre un grupo de pacientes neófitos y antiguos usuarios de lentes hidrofílicas. Nombre del congreso: OPTOM 2016 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Ponencia Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 08/04/2016 Ciudad entidad organizadora: MADRID, España ALBA MARTIN GIL; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ.
- Título del trabajo: La presión intraocular elevada aumenta los niveles de melatonina en el humor acuoso. Nombre del congreso: OPTOM 2016 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: España Fecha de

celebración: 08/04/2016 Ciudad entidad organizadora: MADRID, España
 Hanan Awad Alkozy; Juan Sanchez Naves; MARIA JESUS PEREZ DE LARA;
 JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ;
 ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.

- Título del trabajo: Melatonin and its synthesising inzyme increses under ocular hypertension and glacomatous conditions Nombre del congreso: ARVO 2015 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Denver CO, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 03/05/2015 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América HANAN AWAD ALCOZI; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ.
- Título del trabajo: LASIK VS PRK: A COMPARATIVE STUDY OF THE OCULAR SURFACE INTEGRITY WITH CONFOCAL MICROSCOPY Nombre del congreso: CIOCV 15 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 25/04/2015 Ciudad entidad organizadora: Portugal ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ALBA MARTIN GIL; Alberto Roderó; Miguel Ángel Teus; JESUS JERONIMO PINTOR JUST; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ.
- Título del trabajo: Estudio comparativo de la integridad de la superficie ocular en pacientes tras cirugía refractiva. Lasik vs prk Nombre del congreso: Viser 2014 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 22/11/2014 Ciudad entidad organizadora: SANTIAGO, España ALBA MARTIN GIL; Melisa Subero; BEGOÑA FONSECA

VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ.

- Título del trabajo: ¿Son los nucleótidos procedentes del cristalino responsables del desarrollo del glaucoma? Nombre del congreso: Viser 2014 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 22/11/2014 Ciudad entidad organizadora: SANTIAGO, España Hanan Awad Alkozy; ALBA MARTIN GIL; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Evaluación in vitro e in vivo de la liberación de diadenosin tetrafosfato desde lentes de contacto convencionales Nombre del congreso: ViSER 2014 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 22/11/2014 Ciudad entidad organizadora: SANTIAGO, España BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALBA MARTIN GIL; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; ANA ISABEL GUZMAN ARANGUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; CARMEN OLALLA DOMINGUEZ GODINEZ; José María González Mejjome; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: El análogo de melatonina agomelatina reduce la presión intraocular en conejos con tensión normal e hipertensos. Nombre del congreso: ViSER 2014 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 22/11/2014 Ciudad entidad organizadora: SANTIAGO, España ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALBA MARTIN GIL; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; Antonio Bergua; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.

- Título del trabajo: Melatonin, I1K7 and 5-MCA-NAT potentiate adrenergic receptor-mediated ocular hypotensive effects in rabbits: significance for combination therapy in glaucoma Nombre del congreso: ARVO 2014> Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Orlando, FL, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 04/05/2014 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; FERNANDO HUETE TORAL; ALBA MARTIN GIL; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Hypotensive effect of melatonin a its analogues in different animal models. Nombre del congreso: ARVO 2014 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Orlando FL, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 04/05/2014 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América HANAN AWAD ALCOZI; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; MARIA JESUS PEREZ DE LARA; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Participation of P2Y2 and P2Y6 purinergic receptors in the physio pathology of glaucoma. Nombre del congreso: ARVO 2014 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Orlando FL, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 04/05/2014 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; MARÍA PEREZ DE LARA; ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.

- Título del trabajo: Melatonin analogue Agomelatine reduces intraocular pressure in rabbit with normotensive and hypertensive conditions.
 Nombre del congreso: AOPT - The Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 07/02/2013 Ciudad entidad organizadora: ALICANTE, España ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALBA MARTIN GIL; FERNANDO HUETE TORAL; ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Tear secretion induced by carbachol is mediated by AP4A release Nombre del congreso: AOPT 2013 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 07/02/2013 Ciudad entidad organizadora: ALICANTE, España BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ALBA MARTIN GIL; MIGUEL DIAZ HERNANDEZ; FERNANDO HUETE TORAL; ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Trafficcking of aquaporin-1 mediated by AP4A in rabbit non pigmented ciliary ephitelial cells: Involvement of P2Y2 receptor in IOP raise Nombre del congreso: AOPT 2013 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 07/02/2013 Ciudad entidad organizadora: ALICANTE, España ALBA MARTIN GIL; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; FERNANDO HUETE TORAL; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.

- Título del trabajo: Melatonin and its analogue 5-MCA-NAT potentiate the Ocular hypotensive effect mediated by adrenergic receptors: significance for Glaucoma treatment Nombre del congreso: AOPT 2013 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Ponencia Ciudad de celebración: España Fecha de celebración: 07/02/2013 Ciudad entidad organizadora: ALICANTE, España FERNANDO HUETE TORAL; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ALBA MARTIN GIL; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.
- Título del trabajo: Topical application of anti-depressant compound agomelatine, a melatonin analogue, reduces intraocular pressure Nombre del congreso: ARVO 2012 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Fort Lauderdale, Florida, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 06/05/2012 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América JESUS JERONIMO PINTOR JUST; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA.
- Título del trabajo: 5-MCA-NAT reduces carbonic anydrases expression by means of MT3 melatonin receptors Nombre del congreso: ARVO 2011 Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Fort Lauderdale, Florida, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 30/04/2011 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América MARIA ASUNCION PERAL CERDA; ALMUDENA CROOKE ALVAREZ; FERNANDO HUETE TORAL; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; MARIA PILAR ALARMA ESTRANY; JESUS JERONIMO PINTOR JUST.

PATENTES (2)

Uso de compuestos melatoninérgicos para tratar la superficie ocular. JESUS JERONIMO PINTOR JUST; JUAN GONZALO CARRACEDO RODRIGUEZ; BEGOÑA FONSECA VAZQUEZ; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA. P201500545/5. OCUPHARM SL

Uso de un análogo de la melatonina para la reducción de la presión intraocular. JESUS JERONIMO PINTOR JUST; ALEJANDRO MARTINEZ AGUILA; ANTONIO BERGUA; P201101173. Universidad Complutense de Madrid